

UNIVERSIDADE TIRADENTES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÓLEO  
ESSENCIAL DA *Alpínia zerumbet* NA MIOSITE INDUZIDA  
POR CARRAGENINA NO TECIDO MUSCULAR DO  
GASTROCNÊMIO EM RATAS**

**LUCAS MORAES REGO**

ARACAJU

Fevereiro de 2014

UNIVERSIDADE TIRADENTES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÓLEO  
ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet* NA MIOSITE INDUZIDA  
POR CARRAGENINA NO TECIDO MUSCULAR DO  
GASTROCNÊMIO EM RATAS**

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

**LUCAS MORAES REGO**

**ORIENTADORES:**

**Prof. Edna Aragão de Farias Cândido, D.Sc.**

**Prof. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc.**

ARACAJU

Fevereiro de 2014

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÓLEO  
ESSENCIAL DA *Alpínia zerumbet* NA MIOSITE INDUZIDA  
POR CARRAGENINA NO TECIDO MUSCULAR DO  
GASTROCNÊMIO EM RATAS**

**LUCAS MORAES REGO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDO AO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE DA UNIVERSIDADE  
TIRADENTES COMO REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE

Aprovado por:

---

Profª Dra. Edna Aragão F. Cândido

Orientadora

---

Prof. Dr. Ricardo Luis Cavalcanti de Albuquerque Júnior

Orientador

---

Profª Dra. Margarete Zenardo Gomes

1º Examinadora

---

Prof. Dr. Paulo Autran Leite Lima

2º Examinador

ARACAJU

Fevereiro de 2014

## ***Dedicatória***

***A MEUS PAIS,***

Sem seu apoio, carinho e amor incondicional  
jamais chegaria a lugar algum.

## AGRADECIMENTOS

**A DEUS** *razão de todas as coisas*

**Aos meus pais** Carlos Rêgo Filho e Sônia Maria Morais Rego, referências de amor, carinho e atenção. Esta vitória é de vocês.

Aos meus irmãos, **Ailton(Reitchô) e Elzinha(Xuxu), Adriana (Nana) e Sílvio (Sirvu)**, obrigado por fazerem parte de minha vida em todos os momentos.

Aos meus sobrinhos, **Bianca e Rodrigo, Larissa e Andressa**, por alegrarem nossos momentos de reunião em família e saber que sempre estão juntos nos momentos mais difíceis.

A minha esposa-psicóloga-amiga-amante **Adriana Viana “minha flor”** pela paciência durante estes dois anos e por sempre estar ao meu lado, nesta jornada, apoiando, aconselhando, dando bronca (terapia de choque!!!!). Enfim, é com você que quero passar todos os dias de minha vida.

A minha filha **Ana Beatriz**, filha amada, melhor presente que a vida me deu!!!

As minhas malinhas que vieram juntas no “pacote esposa”, **Bianca e Vinicius**, obrigado por fazerem parte de minha vida de maneira tão marcante e carinhosa.

Aos meus tios, tias e primos, maior bem que possuo: Família

Aos sogros **Oday e Amaral** e o cunhado **Fred**, vocês são minha família também!!!

A Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> **Edna Aragão Farias Cândido**, não tenho palavras para definir o tamanho da gratidão que tenho por você. Jamais conseguirei retribuir tudo o que me ensinou. Você é exemplo de professora, mãe, amiga. Poucas pessoas detêm a capacidade e conhecimento que sobram em você. Muito Obrigado!!!!

ii

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. **Ricardo**, a pessoa mais sincera e verdadeira que conheço. Estar ao seu lado no laboratório foi desfrutar de uma inteligência ímpar e de risadas espetaculares.

Enfim a todos que fazem parte dos Laboratórios do ITP, que me receberam e sempre ajudaram nos momentos mais difíceis. A **Tháise Mendes**, pessoa prestativa, sempre com sorriso no rosto e disposta a ajudar. Obrigado !!!!!!!

iii

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2 CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>10</b>

2.1 Miopatias inflamatórias.....	10
2.2 Inflamação.....	14
2.3 Modelo de inflamação por carragenina.....	18
2.4 <i>Alpinia zerumbet</i> .....	19
REFERÊNCIAS.....	21
<b>3 Ação do efeito ant-inflamatório do óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i> na miosite induzida por carragenina no tecido muscular do gastrocnêmio em ratas</b>	
3.1 RESUMO.....	27
3.2 ABSTRACT.....	27
3.3 INTRODUÇÃO.....	28
3.4 Materiais e métodos.....	29
3.4.1 Delineamento do estudo.....	29
3.4.2 Animais.....	29
3.4.3 Grupos de animais e tratamento.....	29
3.4.4 Avaliação funcional.....	30
3.5 Análise histológica do infiltrado inflamatório.....	31
3.5.1 Preparação de lâminas.....	32
3.5.2 Análise quantitativa da intensidade da reação inflamatória.....	32
3.5.3 Análise estatística.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 RESULTADOS.....	33
4.2 DISCUSSÃO.....	41
4.3 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXOS.....	46

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Imagem do Pawprint test, utilizando-se do programa Axionvision, para mensuração da angulação e do tamanho da passada.....	23
<b>FIGURAS 2A, 2B, 2C E 2D:</b> : Comprimento da passada entre os grupos tratados e controles após indução de miosite por carragenina durante 24 horas.....	33
<b>FIGURAS 3A, 3B, 3C E 3D:</b> : Rotação das patas entre os grupos tratados e controles.....	34
<b>FIGURAS 4A, 4B e 4C:</b> Grupos OEAz (4A), Dexa (4B) e Shan (4C), 120 minutos. Nos grupos OEAz e Dexa manutenção de edema, inflamação da fáscia e diminuição da hiperemia. Grupo Shan com células inflamatórias escassas.....	35
<b>FIGURAS 5A, 5B e 5C:</b> Grupos OEAz (5A), Dexa (5B) e Shan (5C). 24 horas. Nos grupos OEAz e Dexa, redução significativa do edema, de células inflamatórias (linfócitos), ausência de miosite. Grupo Shan, livre de células inflamatórias ou qualquer modificação de sua estrutura anatômica normal.....	36
<b>FIGURAS 6A, 6B, 6C e 6D:</b> Variação da inflamação da fáscia aos 30, 60, 120 minutos e 24 horas, nos grupos Controle, Shan, Dexa e OEAz.....	38
<b>FIGURAS 7A, 7B, 7C e 7D:</b> Variação percentual da intensidade de miosite nos tempos de 30, 60, 120 minutos e 24 horas, nos Grupos Controle, Shan, Dexa e OEAz.....	39

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

PM: Polimiosite

DM: Dermatomiosite

MI: Miopatias inflamatórias

AMPD 1: Monofosfato de adenosina deaminase 1

IMP: Monofosfato de iosina

NF-KB: Fator nuclear Kappa B

CCL: Quimiocinina

CXCL: Quimioquina

DHL: Desidrogenase Láctica

TGO: Transaminase glutâmico-oxalacética

NO: Óxido nítrico

%: Porcentagem

Um: Micrometro

HE: Hematoxilina Eosina

IL: Interleucinas

OEAz: Óleo essencial *Alpínia zerumbet*

PG: Prostaglandina

TNF: Fator de Necrose Tumoral

# **AValiação DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet* NA MIOSITE INDUZIDA POR CARRAGENINA NO TECIDO MUSCULAR DO GASTROCNÊMIO EM RATAS**

## **RESUMO**

As miosites se caracterizam pela inflamação contínua e/ou repetitiva de um ou mais músculos que leva ao indivíduo limitações em suas atividades de vida diária. Classificam-se em Polimiosites e Dermatomiosites. Com o objetivo de avaliar o efeito anti-inflamatório da *Alpinia zerumbet* ante a estes processos inflamatórios. O estudo é genuinamente experimental com abordagem analítica quantitativa. Foram utilizadas 96 ratas adultas pesando entre 200-300g. As ratas receberam para indução da inflamação carragenina Lambda na dosagem de 10 mg/kg. Foram agrupadas em igual quantidade nos seguintes grupos: Shan, Controle, Dexametasona e *Alpinia*. Cada grupo foi subdividido em 30, 60, 120 minutos e 24 horas e neles avaliados os testes comportamentais ( Paw print test, teste Basso, Beattie e Bresnahan e teste de caminhada) e em seguida submetidas a avaliação histológica e sua qualificação. Nos testes funcionais, quando verificada as passadas e a rotação para 24 horas, OEAz x Dexa para  $p < 0,05$  e OEAz x Dexa para  $p < 0,01$ , respectivamente. No estudo histológico, tanto o dexametasona quanto o óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, conseguiram reverter totalmente a miosite, após 24 horas.

**Palavras-chave:** *Alpinia*; inflamação; miosite, gastrocnêmio

# AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet* NA MIOSITE INDUZIDA POR CARRAGENINA NO TECIDO MUSCULAR DO GASTROCNÊMIO EM RATAS

## ABSTRACT

Myositis is characterized by a continuous or repetitive swelling of one or more muscles that produce limitations to the individual in his daily life activities. Those are classified as Polimiosoties and Dermatomiosoties. With the objective of evaluating the anti-swelling effect of the *Alpinia zerumbet* on such swelling processes. The study is genuinely environmental and carries an analytical quantitative approach. 96 adult female rats were used and they weighted between 200-300 grams. The rats received Carragenina Lamb of 10 mg/kg doses to induce the swelling. They were grouped in equal amount in the following groups: Shan, Control, Dexamethasone and *Alpinia*. Each group was sub divided into 30, 60, 120 minutes and 24 hours and on them, behavioral tests (Pawprint Test Basso, Beattie e Bresnahan and walking test) and following to them, they were submitted to a histological and its qualification evaluation. On the Functional tests, once verified the steps and the rotation for 24 hours, OEAz x Dexa for  $p < 0.05$  and OEAz x Dexa for  $p < 0.01$ , respectively. As far as the histological study, as much as the dexamethasone, the essential oil of *Alpinia zerumbet* were able to totally revert the myositis, after 24 hours.

**Keywords:** *Alpinia*; inflammation; myositis; gastrocnemius.

## 1. INTRODUÇÃO

As miopatias inflamatórias se caracterizam por serem um grupo variável de doenças, com alterações do sistema muscular que levam o indivíduo a dificuldades e limitações tanto em suas atividades de vida diária como das laborativas. São reconhecidas através dos subtipos: Polimiosites (PM) e Dermatomiosites (DM), podendo ser primárias ou secundárias a outras patologias, como por exemplo, neoplasias. Podem afetar pessoas em todas as épocas da vida como também ambos os sexos, porém com maior prevalência em mulheres (2:1) e nas faixas etárias entre 5 e 15 anos e 45 e 60 anos (SOLOMON; SWIGRIS; BROWN, 2011).

A inflamação, principal evento biológico ou patológico das miosites, dá-se por uma resposta dos tecidos vascularizados à agressões que podem vir de agentes internos (reações de defesa) e externos (lesões e/ou traumas), gerando uma série de eventos complexos em cascata, essenciais para que o organismo mantenha seu equilíbrio. É um processo que visa eliminar o agente agressor e eliminar produtos resultantes da destruição celular (PIVA et al., 2011).

Os tratamentos medicamentosos preconizados nas miopatias inflamatórias por vezes não são satisfatórios, haja vista a quantidade de sintomas e repercussões no organismo decorrentes desta patologia. O uso dos anti-inflamatórios corticóides e imunossupressores preconizados, ainda não proporcionam uma eficácia total, além disso, causam efeitos adversos ao organismo com seu uso prolongado. É sabido também que a falta de critérios diagnósticos bem estabelecidos e as variações da sintomatologia com seus padrões individuais, dificultam uma padronização do tratamento farmacológico e conseqüentemente a eficácia do tratamento (TAN et al., 2009).

Neste contexto surgem as plantas medicinais que são bastante utilizadas por serem uma alternativa eficiente, vem sendo administradas, por vezes, empiricamente, porém são também objeto de estudo de várias pesquisas e muitas já com comprovação e fundamentação científica e outras tantas em contínuas pesquisas para sua utilização de maneira segura pela população (VICTORIO et al., 2009).

A *Alpinia zerumbet* é uma planta herbácea, da família Zingiberaceae, em que seus principais constituintes são, os mono e os sesquiterpenos. Destes, os de maior concentração incluem; o terpeno-4-ol, 1,8 cineol, rutina e dois derivados glicosídicos do Kaempferol (VICTÓRIO, 2009). Segundo autores como Khalil et al. (2004) e Koh et al.(2002), o terpeno-4-ol e o 1,8 cineol, tem atividade antiinflamatória, baseando esta pesquisa.

Em vista disso, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, através de características derivadas de estudos comportamentais e histomorfológicos após a indução da miosite no gastrocnêmio de ratas, uma vez que os tratamentos medicamentosos atuais, em decorrência das grandes variações de sintomatologias, ainda não conseguem reverter completamente o processo inflamatório da doença, abrindo-se a partir daí a necessidade de novos produtos que possam agir mais satisfatoriamente ante as miosites. O artigo foi enviado para a revista **Revista Brasileira de Medicina do Esporte – RBME cujo qualis na área interdisciplinar é B1. Em anexo se encontram as normas para preparar o manuscrito.**

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. MIOPATIAS INFLAMATÓRIAS

Miopatias inflamatórias (MI) constituem um grupo diverso de síndromes em que a característica principal é a inflamação persistente dos músculos proximais, associada a elevação sérica de enzimas musculares em todas as suas formas de acometimento com significativa perda da mobilidade na região afetada. São geralmente relatadas como idiopáticas e potencialmente tratáveis (PANDY; COLEY; WEDDERBURN, 2012).

As miopatias classificam-se em: *Dermatomiosite*, *Polimiosite* e a *Miosite por inclusão*, as quais possuem características clínicas, histológicas, imunológicas e demográficas únicas. Também podem ser diferenciadas, em seus 3 tipos, por alterações decorrentes do sistema imunológico ou pelos comprometimentos reumáticos, uma vez que causam sintomatologia semelhante às doenças reumáticas. Novos critérios de diagnóstico são essenciais para diferenciá-las e para excluir outros distúrbios que podem estar associados ou serem precursores destas patologias como, por exemplo, neoplasias (DALAKAS; HOHLFELD, 2003; MASTAGLIA, HILTON-JONES, 2007).

A etiologia das miopatias inflamatórias ainda é desconhecida. Há descrições de associação com antígenos de histocompatibilidade, agentes ambientais e autoimunidade com reação inflamatória tecidual, vasculite associada com a presença frequente de autoanticorpos e evidência de motoxidade mediada por células T ou microangiopatia mediada pelo sistema complemento, além da associação constante com outras doenças auto-imunes. A incidência anual de dematomiosite(DM) e polimiosite (PM) é de 10 casos por 1 milhão de indivíduos. A incidência em mulheres é maior do que em homens, numa proporção estimada de 2:1, onde ocorre o surgimento da doença entre 5 – 15 anos de idade e entre 45 – 65 anos. Sendo mais comum na infância a dermatomiosite (FIRESTEIN; KELLEY, 2009).

A relativa semelhança clínica das miosites, combinada com os achados potencialmente sutis podem levar a um atraso no diagnóstico, sendo um complicador do diagnóstico precoce e conseqüentemente para uma melhor resposta ao tratamento. Na infância, as miopatias inflamatórias idiopáticas são um grupo de doenças multissistêmicas raras, mas graves, porém, observadas em apenas 5% dos casos, mostrando a heterogeneidade entre idade inicial e as miosites (DANKO, 2004).

A forma como a doença cursa é variável. Normalmente os pacientes são tratados com glicocorticoides e obtém-se resultados por vezes satisfatórios, principalmente os com DM. Por conseguinte, identificam-se outros padrões evolutivos com um período de remissão inicial que se segue de um ou mais episódios de recidiva, curso monocíclico ou refratário ao tratamento usual (MILLER; RUDNICKIAS, 2004).

Existem fatores de mau prognóstico que podem ser destacados no diagnóstico inicial em idosos; grau avançado de fraqueza muscular no momento do diagnóstico, disfunção da musculatura respiratória, presença de disfagia, demora no início do tratamento após seis meses do início dos sintomas, comprometimento pulmonar (doença intersticial pulmonar) ou cardíaco (miocardite) e associação com neoplasia (SOLOMON; SWINGUSJ; BROWN, 2010). As miosites ainda não são bem entendidas e seu diagnóstico, por vezes, é falho ou mal elaborado, levando ao início tardio do tratamento. Além disso, os tratamentos farmacológicos não tem mostrado resultados satisfatórios com relação a patologia em questão (MACHADO; BRADY; HANNA, 2013).

A principal manifestação é a fraqueza muscular proximal e simétrica em cinturas escapular, pélvica e região cervical, levando a limitações e alterações na marcha, maior gasto energético para realização de simples movimentos das atividades de vida diária que conseqüentemente gera fadiga muscular persistente e limitante. As miopatias compartilham muitas semelhanças, podendo se apresentar de forma aguda, subaguda ou crônica. Estas também compartilham um grau variável ao exame específico de creatina quinase (CK) e de infiltrados inflamatórios além de uma alteração inespecífica e anormal ao eletromiograma que demonstra uma miopatia irritativa, porém sem alterações na condução nervosa (TRANSLEY; BETTERIDGE; MCHUGH, 2013).

Em estudo recente, Castro (2012) classificou como principais manifestações encontradas nas miosites: febre, miosite, disfunção intestinal, Fenômeno de Raynaud, artrites inflamatórias e alterações nas mãos, sendo que 90% dos pacientes estudados desenvolveram as miosites, 50% inflamação nas articulações, em 40% observou-se o Fenômeno de Raynaud e 30% com afecção nas mãos. Apenas 20% desenvolveram quadro febril.

Com relação ao sistema muscular, nas Polimiosites e Dermatomiosites, em que encontra-se o duplo processo inflamação e alteração do sistema auto-imune. O Monofosfato de Adenosina deaminase 1 (AMPD 1) que é uma enzima envolvida no catabolismo de AMP (monofosfato de adenosina) em monofosfato de iosina (IMP) e  $\text{NH}_3$ , liberando assim energia para o processo de contração muscular. Esta enzima, em mais de 50% dos casos de DM e PM, encontra-se deficiente, levando a déficit de energia muscular com perda da mobilidade e fadiga tão típicas nas musculaturas acometidas por estas patologias (PANDY; COLEY; RAYAVAPARU, 2012).

Solomon; Swigris; Brown, 2011 em estudo no *Interstitial Lung Disease Program* e no Autoimune Lung Center em Denver (EUA), verificou que em 5% de pacientes com PM/DM, a fraqueza muscular respiratória, levou a uma hipoventilação, resultando em atelectasia e se tornando um fator complicador da pneumonia. Além disso, refere que complicações decorrentes de pneumonias secundárias ao déficit muscular são responsáveis por óbito em 17% dos pacientes acometidos por PM ou DM.

Nestas patologias musculares há o acúmulo de exsudados inflamatórios de intensidade variável dentro do fascículo muscular. Embora apresentem semelhanças, as miopatias inflamatórias idiopáticas são um grupo heterogêneo. A síndrome de sobreposição (SS) refere-se à associação de PM (Polimiosite), DM (Dermatomiosite), ou NM (Neuromiosite) com doenças do tecido conjuntivo, como esclerodermia ou lúpus eritematoso sistêmico (TAN et al., 2009). Além de anticorpos antinucleares (ANA elevados), pacientes com SS podem apresentar uma maior fraqueza proximal nos braços do que nas pernas, levando a um aspecto parecido com o padrão observado em algumas distrofias musculares (DIMACHKIES; BAROHN, 2012).

Gunawardema, Betteridge e Machugh, 2009, relatam que a DM se diferencia da PM pelo acometimento cutâneo. As pápulas de Gottron são consideradas patognomônicas de DM. São bolhas róseas ou violáceas localizadas nas superfícies extensoras das articulações interfalangeanas e metacarpofalangenas, cotovelos, joelhos e maléolo medial. O sinal de

Gottron é um eritema macular com a mesma distribuição das pápulas de Gottron. O heliótropo, caracterizado por lesões eritematosas ou violáceas nas pálpebras superiores é outro sinal típico (CARSTENS; SCHIMIDT, 2013). Além destes, são observadas manchas ou placas eritematosas desencadeadas por foto-exposição com distribuição característica no tórax superior, ombros e dorso (sinal do xale), e/ou pescoço e tórax anterior em "V" (sinal do decote). Fissuras e descamação podem ocorrer nas polpas digitais dos quirodáctilos, e são referidas como “mãos de mecânico” (HENGSTMAN; HOOGEN; ENGELEN, 2009).

Além disso, a dermatomiosite está associada a um maior risco de malignidade em relação às outras miosites inflamatórias, nestes casos o acometimento pode ser apenas uma sintomatologia decorrente das alterações provocadas por alguns tipos de cânceres, sendo definida a partir daí como uma síndrome para-neoplásica. As neoplasias do ovário, pulmão e colorretal são as mais freqüentemente associadas (CASTRO; BARROSO; PARENTE, 2012).

As dermatomiosites incluem ligações de complexos imunes às células endoteliais com a conseqüente ativação do sistema complemento (Membrana attack complex – MAC), levando a agressão das células envolvidas provocando necrose local. Esta necrose diminui a irrigação sanguínea, provocando atrofia e retração perifascicular, limitando a ação muscular (NISTALA; WEDDERBURN, 2013).

Nistala e Wedderburn (2013) relatam em recente estudo que há um fator genético ligado às miosites. Foi detectada a intermediação do processo inflamatório pelo Fator nuclear Kappa B (NF-KB), em exames realizados nos pacientes adultos e crianças, juntamente com um decréscimo da atividade do inibidor do Kappa B (IKBL), sugerindo uma desordem genética como fator desencadeante das miosites.

Na biopsia muscular realizado no indivíduo acometido por PM ou DM, exame este preponderante para diagnóstico das miosites, são encontrados infiltrados celulares compostos de macrófagos e células T CD8. Estas células podem envolver ou até mesmo invadir células não necróticas, diferenciando assim da dermatomiosite. Na PM o meio inflamatório incluem a participação de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ), quimiocinas como IL-8, CCL-2, CCL-3, CCL-4, CCL-5, CXCL-9 e CXCL-10 que contribuem para a inflamação local e são estímulos para atrair células imunes. Além disso, mediadores inflamatórios são encontrados em grande quantidade no tecido inflamatório, são eles: TGF- $\beta$ , MHC-I, IL-1 $\beta$  e CCL-3 (DANKO, 2004; CARSTENS; SCHIMIDT, 2013).

Com relação aos achados bioquímicos em pacientes com PM e DM, observa-se a positividade do fator antinuclear (FAN) em 80% dos casos. Já em 30%, dos casos, os indivíduos estudados possuem auto-anticorpos específicos (Anti-Jo-1, anti-PL-12, anti-EJ e anti-Mi-2). Alterações na desidrogenase láctica (DHL), na Transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e aldolase, também são achados importantes para o correto diagnóstico (DANKO, 2004).

## **2.2. INFLAMAÇÃO**

A inflamação é uma ação de resposta do organismo diante de agressões de diversas origens tais como: toxinas, substâncias cáusticas, tecido necrótico, traumas mecânicos diretos ou indiretos, radiações, entre outros. Ocorre a liberação de adrenalina e corticoesteróides, com elevação da pressão sanguínea, da frequência cardíaca e dilatação de brônquios e pupilas. Há então uma cascata de extravasamentos de proteínas plasmáticas e leucócitos, com o objetivo de agir local e sistemicamente para reverter ou minimizar a lesão sofrida (PELED et al., 2000).

O aumento da permeabilidade ocorre pelo acúmulo excessivo de histamina, óxido nítrico (NO), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e de outros mediadores. Esta alteração vascular possibilita o extravasamento, o influxo de elementos intravasculares para o espaço extravascular (ARROYO; IRUELA-ARISPE, 2010).

O processo inflamatório trata-se portanto de um mecanismo de defesa, mas pode ela própria ser uma doença ou às vezes ter efeitos clínicos indesejáveis. Doenças auto-imunes, artrite reumatóide e reações de hipersensibilidade, são alterações com base nos fenômenos inflamatórios. Na meningite aguda, por exemplo, a inflamação lesão cerebral que são mais graves do que as alterações causadas apenas pelas bactérias. A própria reparação pode resultar em cicatrizes que podem afetar a estética e a fisiologia dos tecidos, como as articulações e músculos (SCHAIBLE; GRUBB, 1993; LAMANO, 2008).

A principal etiologia da inflamação é sem dúvida a invasão por microorganismos, entretanto qualquer agente nocivo ao organismo pode provocá-la; ex.: calor, frio, traumatismo, substâncias químicas, energia radiante, estímulos elétricos. Mais ainda, quando qualquer destes agentes provoca a morte tecidual, as substâncias liberadas são prejudiciais e aumentam o processo inflamatório (DWORKIN, 2008).

De uma maneira geral na inflamação há reações humorais e celulares para se contraporem aos efeitos prejudiciais do agente agressor. Têm-se a alteração no número de células envolvidas e febre, sendo um mecanismo fundamental para limitação do local, dando início a cicatrização e reparos teciduais primários (DWORKIN, 2008). Qualquer que seja a causa, os aspectos básicos da inflamação são geralmente os mesmos. Deve ser ressaltado também que a inflamação é um processo dinâmico, sofrendo constantes modificações. (PIVA et al., 2011).

É importante realçar que, não há linha divisória entre inflamação e reação imunológica. Na realidade, ocorrem concomitantemente fazendo parte do mesmo processo. Na inflamação aguda, a interação entre fenômenos imunológicos e não imunológicos pode ser menos evidente, sendo pronunciada na crônica (JI et al., 2009).

A resposta inflamatória além de combater o agente agressor, busca eliminar os produtos restantes da lesão dos tecidos, com o objetivo de inferir meios para recuperação/reparação do tecido lesado, com o fim de reestabelecer a estrutura e função do tecido acometido ou agredido (LOPES-MARTINS, 2007).

Os neutrófilos são as células que chegam primeiramente ao foco inflamatório na inflamação aguda. Este recrutamento dos leucócitos para o local da lesão se dá em várias fases em que são envolvidos: o rolamento, adesão ao endotélio, transmigração e migração nos tecidos intersticiais em direção ao estímulo quimiotático, os quais são impulsionados por gradientes quimiotáticos em que reconhecem e fagocitam o agente agressor (ARROYO; IRUELA –ARISPE, 2010).

Para o início, andamento e supressão do processo inflamatório, várias células agem com o objetivo de reequilibrar e defender o organismo de agentes endo ou exógenos que o agridem. Com suas formas e funções específicas agem simultaneamente para tentar debelar o processo e defender o organismo dessas alterações. São elas: Fibroblastos, mastócitos, macrófagos, eosinófilos, célula gigante mononucleada e plasmócitos (PIVA et al., 2011).

A resposta inflamatória é um importante sinal de várias doenças, carecterizados pelo recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório e também pela produção tanto de mediadores pró-inflamatórios, por exemplo, os leucotrienos, prostaglandinas, citosinas pró-inflamatórias IL-1B e o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , quanto pela produção de mediadores anti-inflamatórios como a interleucina 10 (IL-10) (PETERS et al., 2006). Vale destacar que a ciclo-oxigenase (COX)-2, age como enzima-chave que exerce função

fundamental na regulação da formação das prostaglandinas (PG), oriundas do ácido aracádico (A.A) (NAKANISHI; ROSENBERG, 2012).

O primeiro evento da cascata inflamatória é a contração arteriolar transitória que estimula a liberação de mediadores químicos, como prostaglandinas, os quais dão início à dilatação subsequente das arteríolas e levam a hiperemia ativa, além de estarem envolvidas na patogênese da dor e da febre (JI et al, 2009).

Simultaneamente, outros mediadores químicos como histamina, bradicinina, leucotrienos, entre outros, levam ao aumento da permeabilidade das vênulas com a consequente exsudação de um líquido plasmático rico em proteínas – formação do edema. (WULLAERT, BONNET, PASPARAKIS, 2010; COX, 2002).

Lamano (2008) relata que edema inflamatório mediado pela histamina é imediato e de curta duração (resposta imediata transitória), atingindo um pico por volta de 5 a 10 minutos e diminuindo rapidamente a partir desse tempo. O aumento de permeabilidade decorre da contração das células endoteliais das vênulas, provavelmente por serem os vasos com maior quantidade de receptores para este mediador. Outros mediadores também provocam contração das células endoteliais de vênulas e aumento de permeabilidade, porém o edema resultante apresenta algumas diferenças no tempo de instalação e na duração.

O edema retardado prolongado tem uma latência entre a agressão e sua instalação e uma duração de várias horas ou mesmo dias. A agressão térmica moderada provoca edema após 15-75 minutos, que atinge o máximo após 4 horas e tem duração total de cerca de 8 horas, sendo mediado muito provavelmente pela bradicinina (LAMANO, 2008).

Segundo Maranhão (2008), o edema pode também instalar-se subitamente e manter-se por tempo prolongado, chegando a permanecer por vários dias (resposta imediata mantida), em situação de agressão grave (queimadura severa, algumas toxinas bacterianas) que ocasiona necrose das células endoteliais de capilares, vênulas e arteríolas. Nesses casos, o edema dura o tempo necessário para o trombosamento ou o reparo das paredes vasculares. Esses padrões de edema inflamatório constituem modelos experimentais e devem coexistir em muitas respostas inflamatórias humanas, nas quais há uma gradação de gravidade a partir do local da agressão.

Concomitantemente à formação do edema, há o deslocamento dos leucócitos à região agredida. Os leucócitos representam papel fundamental na defesa do organismo com função de fagocitar ou produzir substâncias nocivas aos microorganismos e tecidos necróticos. Os neutrófilos, monócitos, linfócitos e eosinófilos chegam ao local lesionado através da corrente sanguínea, também como objetivo fundamental de proteger o organismo de agentes invasores pós-lesão. Estas células foram objeto do estudo histológico deste trabalho com o objetivo de mensurar o processo inflamatório (JI et al., 2009).

Na fase proliferativa há a multiplicação de fibroblastos que são responsáveis pela organização das fibras colágenas (AMADEU et al. 2003). Os tecidos de granulação formados a partir, principalmente, dos fibroblastos que juntamente com glicosaminoglicanos, fibronectina e colágeno, realizam também a debridação e remodelamento fisiológico (HILDEBRAND, 2005).

Gabbiani (2003) refere que ao novo tecido de granulação, acopla-se a angiogênese, através de brotamento endotelial. Fato este importante para a nutrição e manutenção do tecido neoformado. Com a fase de epitelização dar-se o encontro das bordas da lesão, através do processo mitótico e de hiperplasia do epitélio (POEHLMANN et al. 2012). Já na fase de contração, estabelece-se o movimento do tecido já formado e não a sua produção (PELED et al., 2000).

Hildebrand (2005) relata que na remodelagem ocorre o aumento da força de tensão, diminuição da cicatriz e redução do eritema, além de redirecionamento das fibras colágenas e reabsorção de água. A neovascularização diminui, e tardiamente a cicatriz é considerada avascular. Uma cicatriz normal tem aproximadamente 80% da força de tensão da pele normal, não é volumosa e é plana (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Deste modo, apesar do processo inflamatório ser um mecanismo de defesa do organismo geralmente benéfico, não é incomum a ocorrência de efeitos adversos que se persistirem podem levar a lesões teciduais por vezes definitivas, provocando como no caso das miosites, perda de função com fraqueza muscular associada (DWORKIN, 2008).

### 2.3. MODELO DE INFLAMAÇÃO POR CARRAGENINA

A carragenina é produzida a partir de algas da espécie Rhodophytas. Sendo um grupo complexo de polissacarídeo e repetidos monômeros de galactose (CAMPO et al. 2009). Divide-se em: Iota ( $\Upsilon$ ), Kappa ( $\kappa$ ), Lambda ( $\lambda$ ), Mu ( $\mu$ ), Nu ( $\nu$ ) e Theta ( $\Theta$ ). A carragenina Lambda, objeto deste estudo, é utilizada como agente indutor do processo inflamatório sendo que seu pico de ação se dá entre 2-4h se prolongando por 1 a 2 dias (CICALA et al.,2007).

O modelo inicial data de 1962 e foi descrito por Winter e colaboradores. Uma injeção local inicia uma resposta imediata com invasão local de macrófagos e proliferação de fibroblastos (MOLLER; BERGE; HAMERS, 2008). Os sinais cardinais da inflamação pós-aplicação da carragenina são: edema, hiperalgesia e eritema que se desenvolvem imediatamente após a aplicação (MORRIS, 2003).

Segundo Pinniger, Lavin e Bakker (2012), a fraqueza muscular associada a muitas doenças crônicas tem sido atribuídas ao efeito catabólico de citocinas pró-inflamatórias como é o caso da carragenina. Afeta diretamente a função contrátil e provoca fraqueza muscular e inflamação local, podendo contribuir para o enfraquecimento observado em desordens inflamatórias como nas Polimiosites e Dermatomiosites. Refere ainda, em seu estudo, a utilização na dosagem de 10 mg/kg que conseguiu promover o referido processo inflamatório.

As fases são atualmente aceitas na inflamação induzida por carragenina: a primeira mediada por histamina e 5-hidroxitriptamina, ocorre na primeira hora; a segunda por cininas, em especial a bradicinina, iniciando suas atividades de 1 a 2 horas após a aplicação e da terceira hora em diante, a última fase, caracterizada pela produção de prostaglandinas, notadamente a prostaglandina E. Com este modelo pode-se avaliar as várias etapas que ocorrem no processo inflamatório e, a partir disso, testar alterações motoras e histológicas em diferentes momentos como também avaliar a ação de novos medicamentos diante de quadros inflamatórios que se apresentem em diferentes situações e etiologias (CAMPO et al., 2009).

#### 2.4. *Alpinia zerumbet*

As plantas têm sido utilizadas pela humanidade como base para vários medicamentos e em experimentos diversos. Estima-se que mais de 70% dos medicamentos derivados de plantas foram desenvolvidos com base no conhecimento e utilização popular (CALIXTO, 2000). A Organização Mundial da Saúde estima que 80% da população deste planeta se utiliza de plantas medicinais como medicamentos caseiros além da medicina tradicional que detém remédios oriundos de algumas destas plantas. Somente o Brasil possui cerca de 60.000 espécies de plantas, o que corresponde a cerca de 20% de toda a flora (GARCIA, 1995; VIEGAS et al., 2006).

Originária da Ásia e trazida para o jardim botânico do Rio de Janeiro no século XIX, a espécie *Alpinia zerumbet*, também conhecida como *Alpinia speciosa* é chamada popularmente de “colônia”, “flor de redenção”, “bastão do imperador” e “água de alevante” (SILVA; OLIVEIRA; ARAÚJO, 2008). É uma planta herbácea, robusta e perene com colunas de 2 a 3 metros de altura, lisa e verde com folhas oblongas e pontudas. Além de alternadas são completas e simples, com base aguda e margem inteira. Suas flores são alvas com lacínios róscos no ápice, dispostas em cachos grandes levemente aromatizadas, sendo o fruto em formato de cápsula (KRIECK et al., 2008).

Sendo o maior gênero da família Zingiberaceae, a *Alpinia zerumbet* tem como constituintes químicos: alcalóides, flavonóides, catequina e epicatequina e como principais componentes dessa espécie são os monos e sesquiterpenos com maior concentração de 1,8 cineol e terpeno-4-ol (PRUDENTE et al., 1993; VICTÓRIO et al., 2009).

Santos et al., 2000, relata que os principais monoterpenos encontrados na *Alpinia* foram o terpeno-4-ol (37,62%) e 1,8 cineol (17,58%), além desses o gama terpinen (11,77%) e o para-cimene (10,67%) e outros com porcentagem abaixo de 4,68%. Segundo Cal (2006) O terpeno-4-ol que é uma numerosa classe variada de hidrocarbonetos, apresentou melhor absorção, além de melhor resultado da utilização de solução oleosa em relação a emulsão e hidrogel, os quais foram bem utilizados como veículos, sendo os valores de absorção de 90 microg/cm<sup>2</sup> e 60 microg/cm<sup>2</sup> em emulsão e 5 microg/cm<sup>2</sup> em hidrogel, em dose de 0,75% p/p. O tempo de melhor absorção foi de 1 hora, para fármacos e cosméticos por via dérmica. A absorção desses terpenos aplicados pelo corpo tem porcentagem de 10% a 20% (CAL, 2006; GUENTHER, 2008; LIAO et al., 2012).

Quando utilizados os princípios ativos do óleo de *Alpinia zerumbet* foram observados: atividade relaxante de duodeno, onde o terpeno-4-ol, quando administrado na dose de 60 mM inibe a sua contração fásica, provavelmente pelo antagonismo de cálcio dependente, relatados por Liao et al., (2012) e ação anti-inflamatória e redutora da substância P, segundo Juergens et al. (1998). Além disso foi constatado o 1,8-cineol com efeito anti-inflamatório de vias aéreas, evidenciados em estudos realizados por Santos et al. (2000), Koh et al. (2002) e Cal (2006).

Mendonça et al, (1991), em pesquisas pré-clínicas demonstrou vários resultados: A dose letal (DL50) do extrato hidroalcoólico foi observado na dose de 10g/kg. A DL50 e a dose mínima não letal (DMNL) não apresentou efeito tóxico ou irritante. O extrato aquoso foi praticamente atóxico. Em pesquisa, onde o tempo de indução e o tempo de duração do sono, foram estudados, observou-se um aumento do tempo de sono nos animais. O terpeno-4-ol, em pesquisas pré-clínicas apresentou efeitos anti-inflamatórios e redutor da substância P que é responsável pelo controle da dor na medula espinhal (KHALIL et al. 2004).

Importante efeito inibidor da inflamação foi atribuído ao terpeno-4-ol e ao 1,8 cineol, através de estudos realizados por Koh, (2002) e Khalil et al., (2004), através de estudo realizado em humanos. Já Mpalantinos et al.,(1998) descreveram atividades biológicas como efeito diurético, hipotensor e antiulcerogênico. Atividade analgésica periférica, anticonvulsivante, antimicrobiana e antifúngica, foram descritas em estudos de Di Stasi (2002) e Lima (1993).

Juergens et al, (1998), estudou o 1,8 cineol, observando efeito anti-inflamatório, através de ação na prostaglandina 2, além de inibição na produção de Fator de Necrose Tumoral (TNF) e interleucina 1, leucitrieno4 e tromboxano. Já nas pesquisas clínicas com o óleo de *Alpinia zerumbet*, segundo Laranja et al, (1991;1992), houve redução de pressão arterial, com aumento da diurese e atividade anti ulcerogênica, ao ingerir o chá das folhas da colônia. Além da atividade diurética, Bezerra et al., (2000) refere em seu estudo pré-clínico atividades anti-espasmódicas e efeito relaxante do tônus basal de íleo de ratos. Lima et al., 2003 relatou ótima atividade moluscida e larvicida.

Santos et al. (2011) estudaram a atividade farmacológica do óleo de *A. zerumbet* em canais de K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> de células nervosas e concluíram que o óleo de *A. zerumbet* apresentou maior atividade farmacológica sobre os canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo *High Voltage Activated* (HVA), foi menos ativo sobre os canais de K<sup>+</sup> e menos ativo ainda sobre os canais de Ca<sup>2+</sup> tipo *Low Voltage Activated* (LVA).

## REFERENCIAS

1. AMADEU, T. P.; COULOMB, B. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. **Int. J. Low. Extrem. Wounds**. v. 2, n. 2, p. 60-68, 2003.
2. ARROYO, A.G.; IRUELA-ARISPE, M.L. Extracellular matrix, inflammation and the angiogenic response. **Cardiovascular Research**, v. 86, n.2, p. 226-235. 2010.
3. CAL, K. How does the type of vehicle influence the in vitro skin absorption and elimination kinetics of terpenes? **Archives of Dermatological Research**, v.297, n.7, p.311-315, 2006.
4. CALIXTO JB. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 33, n.5, p. 179-189, 2000.
5. CAMPO V.L.; KAWANO D.F.; DA SILVA JR D.B.; CARVALHO I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analyses – a review. **Carbohydrate Polymers**. v.77 n.2 p. 167-180, 2009.
6. CARSTENS P.; SCHMIDT J. Diagnosis, pathogenesis and treatment of myositis: recent advances. v. 35, n.2, p. 1 a 15, 2013.
7. CASTRO A. S.; BARROSO A.; PARENTE B. Dermatomiosite como primeira manifestação de uma neoplasia pulmonar. Portuguese journal of pulmonology. **Elsevier**. 2012.
8. CICALA C.; MORELLO S.; ALFIERI A.; VELLESCO V.; MARZOCCO S.; AUTORES G. Haemostatic imbalance following carrageenan – induced rat paw. **European Journal Pharmacology**. v.577 p. 156-161, 2007.
9. COX, J.M. Dor lombar: Mecanismo, Diagnóstico e Tratamento. **Ed. Manole**. 6º Ed. p. 143-146. 2002.

10. DALAKAS M.C.; HOHLFELD R. Polymyositis and dermatomyositis. **The Lancet**, v. 302. n.2, p. 971-982, 2003.
11. DANKO, K. Long-term survival of patients with idiopathic inflammatory myopathies according to clinical features: a longitudinal study of 162 cases. **Medicine**, v. 83. p. 35-42. 2004.
12. DIMACHKIES M.M.; BAROHN R.J. Idiopathic inflammatory miopathies. **Seminology Neurological**. v.32, n.3, p. 227-36, 2012.
13. DI STASI, L.; HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2 ed. **ver. Ampli.** São Paulo: Ed. UNESP, 2002.
14. DWORKIN, J.P. Laryngitis: types, causes and treatments. **Otolaryngologic Clinics of North América**, v.41, n. 2, p. 419-436. 2008.
15. FIRESTEN G.S; KELLEY W.N. Myopaties. **Kelley's textbook of rheumatology**, 9º ed. v.2, 2009.
16. GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **Journal Pathology**, v. 200, n. 4, p. 500-503, 2003.
17. GARCIA E.S. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. **Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro**. v. 11, n.3, p.495-500, 1995.
18. GUENTHER E. **The Essential Oils – History – Origin in Plants – Production**. Analysis Editora: Read Books. v. 1, n.2, p. 456, 2008.
19. GUNAWARDENA H.; BETTERIDGE Z.E.; MCHUGH N.J. Myositis-specific autoantibodies: their clinical and pathogenic significance in disease expression. **Rheumatology**, 2009. vol 48, n.6, p. 607-612. 2009.
20. HENGSTMAN G.J.; HOOGEN F.H.; ENGELEN B.G. Treatment of the inflammatory myopathies: update and practical recommendations. **Expert Opinion Pharmacother**, v. 10. p. 1183-1190. 2009.

21. HILDEBRAND, K. A. et al. Rabbit knee model of post-traumatic joint contractures: the long-term natural history of motion loss and myofibroblasts. **Journal Orthopedic Research**. v. 22, n. 2, p. 313-320, 2004.
22. JI R.R.; GEREAU R.W.T.; MALCANGIO M.; STRICHARTZ G.R. MAP kinase and pain. **Brain Res Rev**, v.60, n.4, p.48-135, 2009.
23. JUERGENS U.R; STOBER M; SCHMIDT-SCHILLING L; KLEUVER T; VETTER H. Antiinflammatory effects of euclyptol (1,8-cineole) in bronquial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes ex vivo. **Europe Journal Medicine Research**, v.3, n.2, p. 407-412, 1998.
24. KHALIL Y; PEARCE A.L; SATKUNANATHAN N; STORER E; FINLAY-JONES J.J; HART P.H. Regulation of Wheal and Flare by Tea Tree Oil: Complementary Human and Rodent Studies. **Journal of Investigate Dermatology**, v. 123, n.4, p. 683-90, 2004.
25. KOH K.J; PEARCE A.L; MARSHMAN G; FINLAY-JONES J.J; HART P.H. Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. **British Journal of Dermatology**, v.147, n.6, p.1212-17, 2002.
26. KRIECK C; FINATTO T; MULLER T.S; GUERRA M.P; ORTH A.I. Biologia reprodutiva de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M.Sm. (Zingiberaceae) em Florianópolis, Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Médicas**, v.10, n.2, p.103-110, 2008.
27. LARANJA S.M; BERGAMASCHI C.M; SCHOR N. Evaluation of acute administration of natural products with potential diuretic effects, in humans. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n.2, p.237-40, 1992.
28. LIAO, J.C; DENG, J.S; CHIU, C.S; HOU, W.C.; HUANG, S.S.; SHIE, P.H.; HUANG, G.J. Anti-inflammatory activities of cinnamomum cassia constituents in vitro and in vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.4, p.1-12, 2012.
29. LOPES-MARTINS, R. A. B. Novos paradigmas no processo inflamatório: Possíveis mecanismos de ação da laserterapia de baixa intensidade e considerações sobre dosimetria. **J. Bras. Laser**, v.1, n.2, p. 12-19, abr./jun. 2007.

30. MENDONÇA, V.L.M; OLIVEIRA, C.L.A; CRAVEIRO, A.A; RAO, V.S; FONTELES, M.C. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n.2, p. 93-7, 1991.
31. MACHADO P.; BRADY S.; HANNA M.G. Update in inclusion body myosites. **Current Opinion Rheumatology** . v.25, n.6, p.763-771. 2013.
32. MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia** v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.
33. MARANHÃO, R.P.A. **Aspectos epidemiológicos de alterações do aparelho locomotor e uso da arnica Montana no tratamento da tendinite experimental em eqüinos**. Doutorado em Ciência Animal – Escola Veterinária da Universidade Federal de Goiás. P. 75-77, 2008
34. MASTAGLIA F.L.; HILTON-JONES D , Handbook of Clinical Neurology, *Myopathies* , **Elsevier Ltd**, The Netherlands, 2007.
35. MILLER M.L; RUDNICKI S.A. Initial treatment of dermatomyositis and polymyositis in adults . v. 83, n.1, p. 35-42, 2004.
36. MOLLER K.A.; BERGE O.; HAMERS F.P.T. Using the catwalk method to assess weight bearing and pain behavior in walking rats with ankle joint monoarthritis induced by carrageenan: Effects of morphine and rofecoxib. **J of Neuro Methods**. v.174, n.4, p.1-9, 2008.
37. MORRIS C.I. Carrageenan – induced paw edema in the rat and mouse. **Methods Mol. Biol.** v.225, n.15, p. 115-121, 2003.
38. NISTALA K.; WEDDERBURN L.R. Update in juvenile myositis. **Curr. Opin. Rheumatol.** vol.25, n.6, p.742-746. 2013.
39. PANDY, G.S.; COLEY, W.; RAYAVARAPU, S. The molecular basis of skeletal muscle weakness in mouse model of inflammatory myopathy. **Arthritis & Rheumatism**. v. 64 n.11 p. 3750-3759. 2012.

40. PELED, Z. M. et al. Response to tissue injury. **Clinic Plastic Surgie**, v. 27, n.8, p. 489-500, 2000.
41. PINNIGER, G.J.; LAVIN, T.; BAKKER A.J. Skelectal muscle weakness caused by carrageenan iduced inflammation. **Muscle and nerve**. v. 46, n.2, p. 413-420. 2012.
42. PIVA, J.A.A.C.; ABREU, E.M.C.; SILVA, V.S.; NICOLAU, R.A. Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: princípios básicos. **Revista Brasileira de Dermatologia**. v.86, n.5, p. 947-954, 2011.
43. PRUDENT, D.; PERINEAU F; BESSIERE J.M; MICHEL G; BRAVO R. Chemical analyses, bacteriostatic and fungistatic, properties of the essencial oil of the atoumau from Martinique (*Alpinia speciosa* K.Schum.) **J of essent oil research**, v.5, n.3, p. 255-64, 1993.
44. PHOEHLMANN, A.; KUESTER, D.; MALFERTHEINER, P.; GUENTHER, T.; ROESSNER, A. Inflammation and Barret´s carcinogenesis. **Pathology, research and practice**, v. 208, n.5, p. 269-280, 2012.
45. RIVLIN A.S.; TATOR, C.H. Objective clinicalassessment of motor function after spinalcord injury in the rat. **Journal Neurosurg**, v.47,n.3, p.577-581, 1997.
46. SANTOS, B.A; ROMAN-CAMPOS, D; CARVALHO, M.S; MIRANDA, F.M.F; CARNEIRO, D.C; CAVALCANTE, P.H; CÂNDIDO, E.A.F; XAVIER FILHO, L; CRUZ, J.S, GONDIM, A.N.S. Cardiodepressive effect elicited by de essencial oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type Ca<sup>2+</sup> current blockade. **Phytomedicine**, v.18, p. 539-543, 2011.
47. SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essencial oils. **Phytotherapy Research**, v.14, n.4 p.240-4, 2000.
48. SCHAIBLE H.G.; GRUBB B.D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. **Pain** ,v. 55, n.1, p.54-5. 1993.

49. SILVA, F.L.A.; OLIVEIRA, R.A.G; ARAÚJO, E.C. Use of medicinal plants by the elders at a Family health strategy. **Revista de enfermagem UFPE**. v.2, n.1, p.9-16, 2008.
50. SOLOMON J.; SWIGRIS J.J; BROWN K. Myositis-related interstitial lung disease and antisynthetase syndrome. **Jornal Brasileiro Pneumologia**. vol. 37, n.3, p. 100-109. 2011.
51. TAN J.A.; ROBERTS-THOMSON P.J.; BILIMBERGS P.; HAKENDORT P.; COX S.R.; LIMAYE V. Incidence and prevalence of idiopathic inflammatory myopathies in South Australia: a 30 year epidemiologic study of histology – proven cases, 2009.
52. TRANSLEY S.L.; BETTERIDGE Z.E.; MCHUGH N.J. Update in the diagnostic utility of antibodies in adult and juvenile myositis. **Current Opinion Rheumatology** vol.25, n.6, p.772-777. 2013.
53. VICTORIO, C.P.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; LAGE, C.L.S. Chemical composition of the fractions of leaf oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. And antimicrobial activity. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.93, n.4 p.697-701, jul/set. 2009.
54. VIEGAS J.R.P; BOLZANI V.S.; BARREIRO E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. v.29, n.2., 2006.
55. WULLAERT, A.; BONNET, M.C.; PASPARAKIS, M.; NF- $\kappa$ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. **NPG**, v.21, n.2 p. 146 – 158, 2010.

### 3. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Alpinia zerumbet* NA MIOSITE INDUZIDA POR CARRAGENINA NO TECIDO MUSCULAR DO GASTROCNÊMIO EM RATAS

#### 3.1 RESUMO

*Objetivo:* Avaliar o efeito anti-inflamatório da *Alpinia zerumbet* ante a estes processos inflamatórios.

*Métodos:* O estudo é genuinamente experimental com abordagem analítica quantitativa. Foram utilizadas 96 ratas adultas pesando entre 200-300g. As ratas receberam para indução da inflamação carragenina Lambda na dosagem de 10 mg/kg. Foram agrupadas em igual quantidade nos seguintes grupos: Shan, Controle, Dexametasona e *Alpinia*. Cada grupo foi subdividido em 30, 60, 120 minutos e 24 horas e neles avaliados os testes comportamentais ( Paw print test, teste Basso, Beattie e Bresnahan e teste de caminhada) e em seguida submetidas a avaliação histológica e sua qualificação.

*Resultados:* Nos testes funcionais, quando verificada as passadas e a rotação para 24 horas, OEAz x Dexa para  $p < 0,05$  e OEAz x Dexa para  $p < 0,01$ , respectivamente.

*Conclusão:* Tanto o dexametasona quanto o óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, conseguiram reverter totalmente a miosite, após 24 horas, ao exame histológico.

**Palavras-chave:** *Alpinia*; inflamação; miosite, gastrocnêmio

#### 3.2 ABSTRACT

*Objective:* Those are classified as Polimiosities and Dermatomiosities. With the objective of evaluating the anti-swelling effect of the *Alpinia zerumbet* on such swelling processes.

*Methods:* The study is genuinely environmental and carries an analytical quantitative approach. 96 adult female rats were used and they weighted between 200-300 grams. The rats received Carrageenams Lamb of 10 mg/kg doses to induce the swelling. They were grouped in equal amount in the following groups: Shan, Control, Dexamethasone and *Alpinia*. Each group was sub divided into 30, 60, 120 minutes and 24 hours and on them, behavioral tests (Pawprint Test Basso, Beattie e Bresnahan and walking test) and following to them, they were submitted to a histological and its qualification evaluation.

*Results:* On the Functional tests, once verified the steps and the rotation for 24 hours, OEAz x Dexa for  $p < 0.05$  and OEAz x Dexa for  $p < 0.01$ , respectively.

*Conclusion:* As far as the histological study, as much as the dexamethasone, the essential oil of *Alpinia zerumbet* were able to totally revert the myositis, after 24 hours.

**Keywords:** *Alpinia*; inflammation; myositis; gastrocnemius.

### 3.3 INTRODUÇÃO

As miopatias inflamatórias se caracterizam por serem um grupo variável de doenças, com alterações do sistema muscular que levam o indivíduo a dificuldades e limitações tanto em suas atividades de vida diária como das laborativas. São reconhecidas através dos subtipos: Polimiosites (PM) e Dermatomiosites (DM), podendo ser primárias ou secundárias a outras patologias, como por exemplo, neoplasias. Podem afetar pessoas em todas as épocas da vida como também ambos os sexos, porém com maior prevalência em mulheres (2:1) e nas faixas etárias entre 5 e 15 anos e 45 e 60 anos(SOLOMON; SWIGRIS; BROWN, 2011).

A inflamação, principal evento biológico ou patológico das miosites, dá-se por uma resposta dos tecidos vascularizados à agressões que podem vir de agentes internos (reações de defesa) e externos (lesões e/ou traumas), gerando uma série de eventos complexos em cascata, essenciais para que o organismo mantenha seu equilíbrio. É um processo que visa eliminar o agente agressor e eliminar produtos resultantes da destruição celular (PIVA et al., 2011).

Os tratamentos medicamentosos preconizados nas miopatias inflamatórias por vezes não são satisfatórios, haja vista a quantidade de sintomas e repercussões no organismo decorrentes desta patologia. O uso dos anti-inflamatórios corticóides e imunossupressores preconizados, ainda não proporcionam uma eficácia total, além disso, causam efeitos adversos ao organismo com seu uso prolongado. É sabido também que a falta de critérios diagnósticos bem estabelecidos e as variações da sintomatologia com seus padrões individuais, dificultam uma padronização do tratamento farmacológico e conseqüentemente a eficácia do tratamento (TAN et al., 2009).

Neste contexto surgem as plantas medicinais que são bastante utilizadas por serem uma alternativa eficiente, vem sendo administradas, por vezes, empiricamente, porém são também objeto de estudo de várias pesquisas e muitas já com comprovação e fundamentação científica e outras tantas em contínuas pesquisas para sua utilização de maneira segura pela população (VICTORIO et al., 2009).

A *Alpínia zerumbet* que é uma planta herbácea, da família Zingiberaceae, tendo como principais constituintes, os mono e os sesquiterpenos, sendo os de maior concentração; o terpeno-4-ol, 1,8 cineol, rutina e dois derivados glicosídicos do Kaempferol

(VICTÓRIO, 2009). Segundo autores como Khalil et al.(2004) e Koh et al.(2002), o terpeno-4-ol e o 1,8 cineol, tem atividade antiinflamatória, baseando esta pesquisa cujo objetivo foi verificar sua ação em tecido muscular inflamado.

## **3.4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO**

A pesquisa trata-se de um estudo em animais genuinamente experimental com abordagem analítica quantitativa que se propôs a avaliar a ação anti-inflamatória da *Alpinia zerumbet* no tecido muscular e como também avaliar possíveis alterações motoras, através do testes funcionais.

### **3.4.2 ANIMAIS**

Foram utilizadas 96 ratas da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), adultas pesando entre 200-300 gramas provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes. Todos os protocolos experimentais foram submetidos a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal desta Universidade (CEUA/UNIT 021213\_anexo A).

Os animais ficaram alojados em gaiolas de polipropileno e grades metálicas apropriadas, em grupos de três. A temperatura local foi mantida entre 21 +- 2 °C e a umidade relativa de 30 a 70%. A iluminação artificial, com ciclo claro e escuro (12/12h) e todos os animais tiveram acesso livre a alimentação (ração específica) e água. O número de animais foi reduzido ao mínimo cientificamente aceitável, sendo utilizados 06 animais por subgrupo.

### **3.4.3 Grupos de animais e tratamento**

Os animais foram divididos em grupos e subgrupos com seis ratas (n=6/subgrupo) cada, sendo as distribuições aleatórias, conforme descrito a seguir. Todos os grupos são subdivididos em 30, 60, 120 minutos e 24 horas.

**GRUPO OEAz:** Indução da miosite por carragenina e aplicação do OEAz

**GRUPO DEXA:** Indução da miosite por carragenina e aplicação do Dexametasona.

**GRUPO SHAM:** Aplicação de soro fisiológico

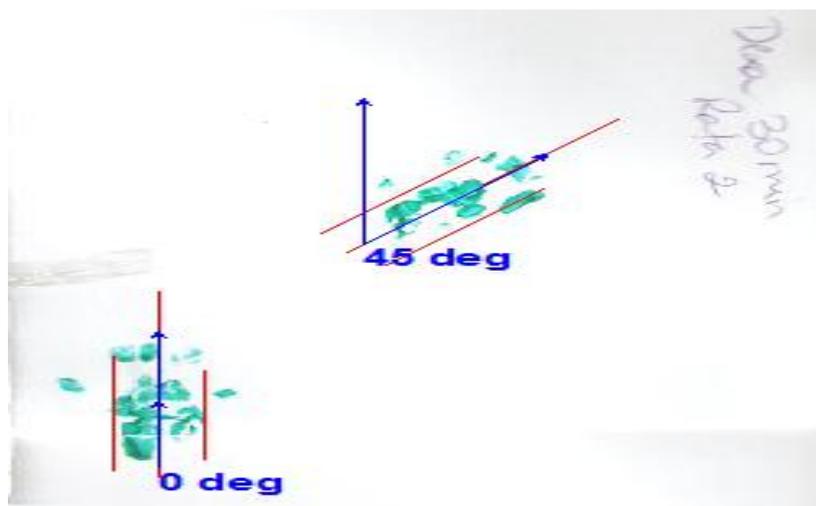
**GRUPO CONTROLE:** Sem tratamento.

Para indução da miosite, foi aplicada uma injeção de carragenina na dosagem de 10 mg/kg (PINNIGER; LAVIN; BAKKER, 2012), no ventre muscular do gastrocnêmio esquerdo, na linha média entre o platô tibial e o calcâneo. A aplicação da *Alpínia zerumbet* como do Dexametasona(creme), deram-se por via dermal, na mesma região aonde foi aplicada a carragenina, na dosagem de 0,05ml/2kg. No caso do OEAZ sua concentração foi de 33% diluído em óleo vegetal. As aplicações tanto do OEAZ como da dexametasona se deram 10 minutos antes da indução por carragenina, respeitando o período de ação para as substâncias envolvidas.

#### **3.4.4 Avaliação funcional**

Para a avaliação funcional, três testes foram realizados em todos os grupos/subgrupos: Teste da capacidade motora (RIVLIN; TATOR, 1997), BBB teste (BASSO, BEATTIE; BRESNAHAM, 1995) e o Paw Print Test (COSTA, 2009).

O Paw print test (Costa, 1999) é realizado em um caixote medindo (10x10x70cm). Com o tamanho de 35cm, foi colocado uma folha de papel branco no piso do caixote. As patas serão molhadas com tinta preta não-tóxica com o objetivo de fazer a impressão na folha de papel. A medida da angulação de rotação da pata, baseou-se em linhas traçadas iniciando do calcâneo, aonde a primeira passa pela linha média da pata e a segunda pelo bordo lateral, formando o ângulo encontrado em graus. Para esta medição utilizou-se o programa Axionvision que permite a mensuração tanto do comprimento e largura das passadas como do ângulo de rotação (Figura 1).



**FIGURA 1:** Imagem do Pawprint test, utilizando-se do programa Axionvision, para mensuração da angulação e do tamanho da passada.

O protocolo descrito por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995) em anexo, se utiliza de escala de avaliação locomotora padronizada. Os itens avaliados são os movimentos das patas, sua coordenação, firmeza e comportamento do tronco. E seus subitens são: movimento do membro posterior, posição do tronco, abdome, posição da pata, caminhada, posição predominante da pata, instabilidade do corpo e rabo.(Anexo B)

Na avaliação da Capacidade motora (RIVLIN; TATOR, 1977) foi observada a atividade espontânea do animal em campo aberto e sem obstáculo na dimensão de 1m<sup>2</sup> por 4 minutos. Caso não seja observada alteração, o animal foi colocado em percurso de madeira com larguras variadas e progressivas de diminuição, começando com 7,7cm e terminando com 1,7cm e progressão de 1cm entre elas, totalizando assim sete barras. Esse percurso terá altura de 60 cm e 1 metro de extensão.

### **3.5 Análise histológica do infiltrado inflamatório**

#### **3.5.1 Preparação das lâminas**

Após os testes, as ratas foram submetidas a deslocamento cervical, foi retirado o gastrocnêmio e colocados em solução de formol a 10% por 48 horas. Decorrido este prazo os gastrocnêmios foram seccionados transversalmente, desidratadas em álcool,

diafanizadas em xilol e feita inclusão em parafinas sob a forma de blocos. Os blocos foram colocados no micrótomo e obtidos cortes com 4 micrometros de espessura, sendo a seguir submetidos à coloração Hematoxilina/Eosina (HE). Os cortes histológicos foram analisados qualitativamente utilizando microscopia de luz para avaliar o padrão e intensidade das alterações teciduais.

### **3.5.2 Análise quantitativa da intensidade da reação inflamatória (secções coradas em HE)**

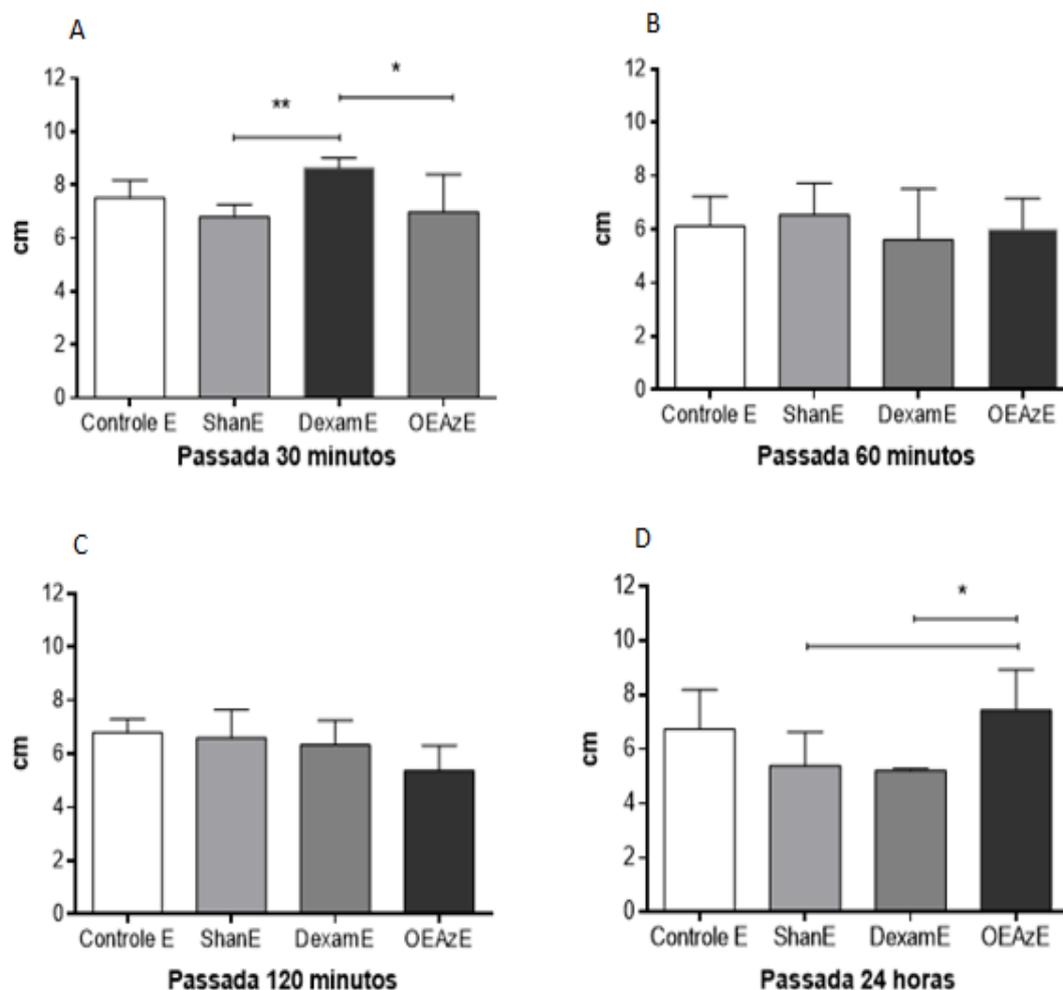
Para avaliação das características histomorfológicas referentes ao processo inflamatório deflagrado pela carragenina, foram analisadas as secções histológicas coradas em Hematoxilina e Eosina, segundo Albuquerque Júnior, Barreto e Pires ( 2009), observando-se os seguintes critérios: presença ou não de edema, hiperemia, inflamação na fáscia e presença de miosite, atribuindo-se o seguinte escore: 0 – ausente, 1- leve, 2 – moderado e 3 - intenso. A classificação da reação inflamatória foi estabelecida de acordo com os tipos de leucócitos predominantes aonde na aguda predominará polimorfonucleares, a subaguda, quantidade semelhante de células mononucleares e polimorfonucleares, a crônica inespecífica predominando linfócito e/ou plasmócito e a crônica específica de predomínio de macrófago e gigantócitos.

### **3.5.3 Análise estatística**

A tabulação de dados e tabelas foram confeccionadas através do Programa Microsoft Excel 2010. Já gráficos e estatística pelo programa GraphPad Prim 6.01. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para analisar a normalidade dos dados das variáveis estudadas. Na análise das médias de mais de duas amostras não relacionadas entre grupos foi utilizado o teste ANOVA ONE WAY e o pós teste Tukey ou Kruskal-Wallis. E para comparar o grupo controle dos demais grupos tratados, o pós teste Dunn's. Em todas as análises foi utilizado o nível de significância de 5%.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 RESULTADOS



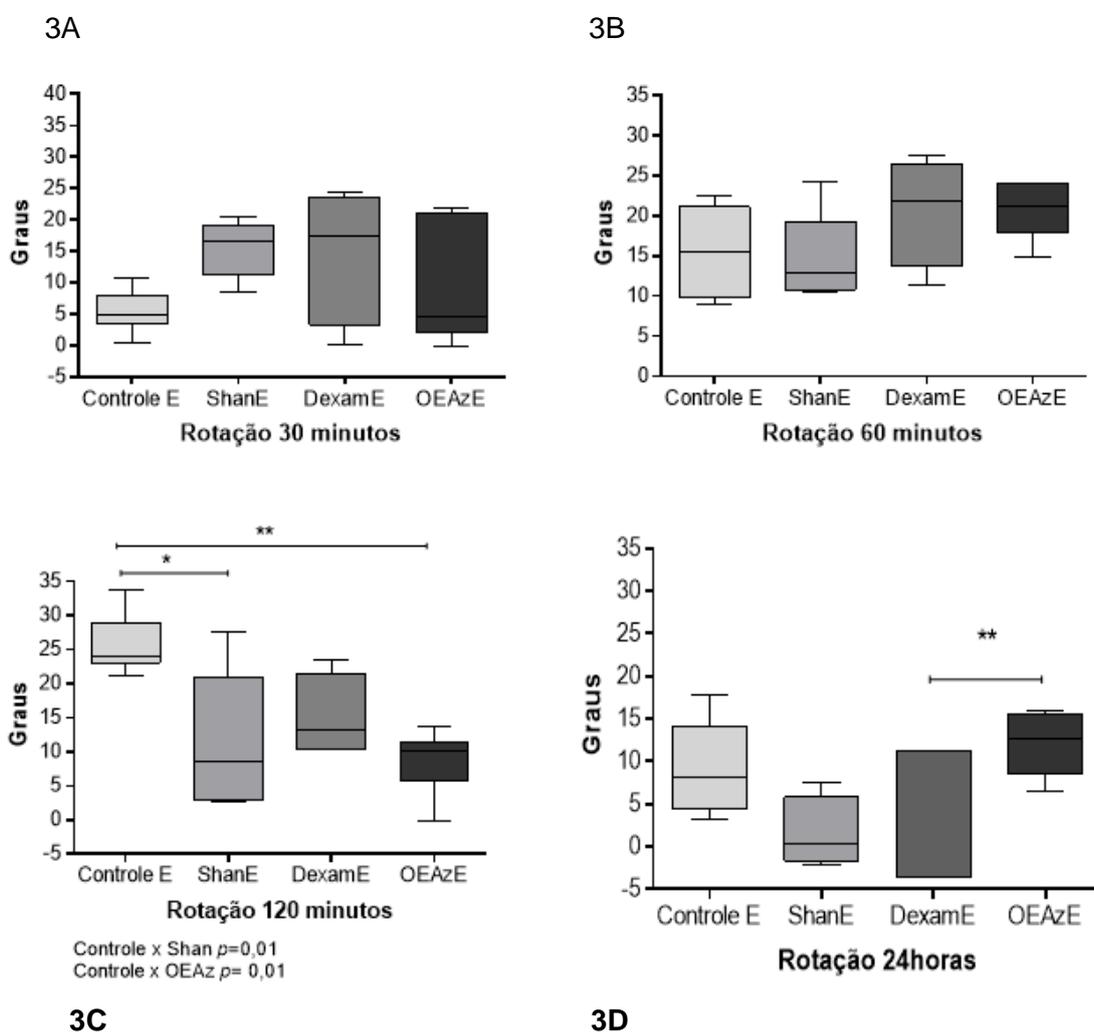
**FIGURAS 2A, 2B, 2C E 2D:** : Comprimento da passada entre os grupos tratados e controles após indução de miosite por carragenina durante 24 horas.

**Legenda:** Paw print test. Verificação do tamanho da passada entre os grupos. Aos 30 minutos DexamE x ShanE para  $p < 0,01$  e DexamE x OEAzE para  $p < 0,05$ . Ao tempo de 24 horas, OEAzE x DexamE para  $p < 0,05$  e OEAzE x ShanE com  $p < 0,05$ . Na análise do teste ANOVA ONE WAY.

Após o Paw Print Test, as imagens foram scaneadas e colocadas no programa AxionVision, onde foi mensurada a passada que é a distância percorrida entre uma pegada e a seguinte em relação à mesma pata. Quanto menor a passada, podemos aferir maior

dificuldade de locomoção e de equilíbrio. As figuras 2A, 2B, 2C e 2D, mostram a mensuração destas passadas nos tempos de 30, 60, 90 minutos e 24 horas.

No gráfico 2A, houve diferença significativa do grupo Dexametasona em relação ao grupo Sham ( $p < 0,01$ ) e em relação ao grupo OEAz para  $p < 0,05$ . Já no 2B e 2C, aos 60 e 120 minutos, respectivamente, os grupos se mantiveram regulares e portanto sem diferença significativa entre eles. No grupo 2D, transcorridas 24 horas, mostra uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do grupo OEAz em relação ao grupo Dexametasona e ao grupo Sham e mostrando similaridade ao grupo controle.

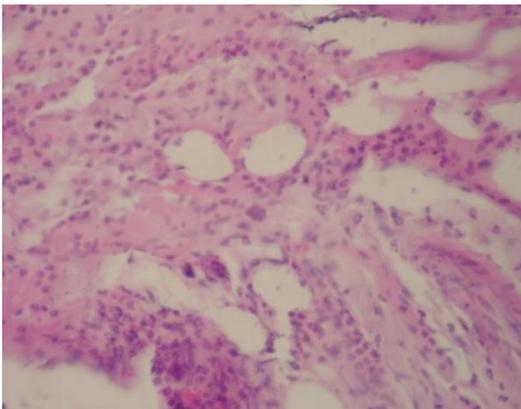


**FIGURAS 3A, 3B, 3C E 3D:** : Rotação das patas entre os grupos tratados e controles.

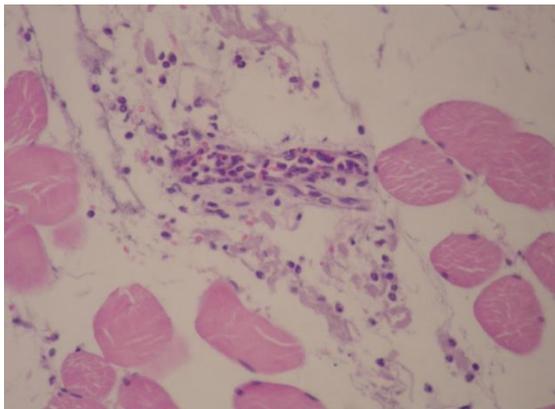
**Legenda:** Paw print test. Verificação do tamanho da rotação das patas entre os grupos. Aos 120 minutos Controle x Shan para  $p < 0,05$  e Controle x OEAz para  $p < 0,01$ . Ao tempo de 24 horas, OEAz x Dexa para  $p < 0,01$ . Na análise do teste ANOVA ONE WAY.

Nos gráficos 3A, 3B, 3C e 3D, foram avaliadas as rotações patas nos tempos já pré determinados. A rotação indica que a rata está colocando maior ou menor carga no membro aferido. Uma rotação externa maior indica carga maior no membro, uma vez que com a rotação outras musculaturas externas entram para auxiliar na carga e movimentação, ou seja, quanto maior a angulação do grupo tratado, melhor o apoio na pata acometida. Nos gráficos 3A e 3B, 30 e 60 minutos respectivamente, não houve diferença significativa entre os grupos, porém aos noventa minutos, representada pelo gráfico 3C, observa-se diferença significativa do controle em relação ao grupo Shan para  $p < 0,05$  e controle x grupo OEAz para  $p < 0,01$ . Já na figura 3D, 24 horas, foi observado que os grupos Shan e Dexa apresentaram rotação interna, porém com diferença significativa entre o grupo Dexa e OEAz. Ou seja, o grupo OEAz apresentou melhor resultado de rotação com comportamento semelhante ao grupo controle e melhor média de rotação externa entre os grupos avaliados.

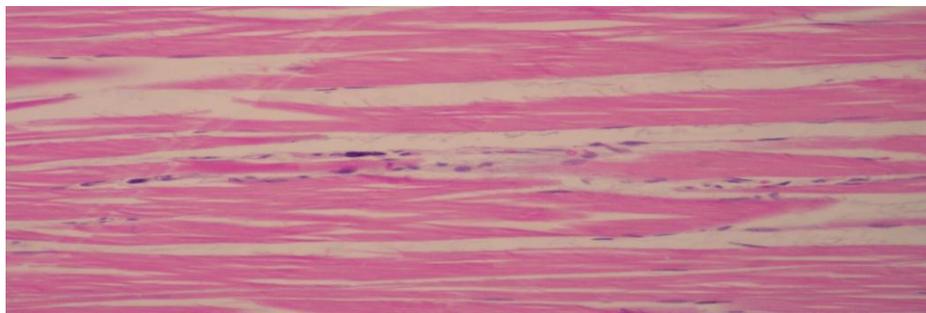
4A



4B



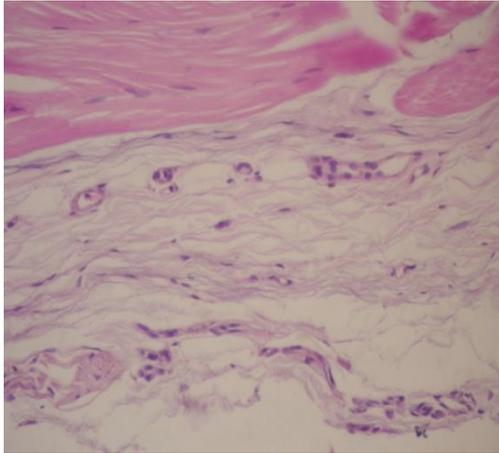
4C



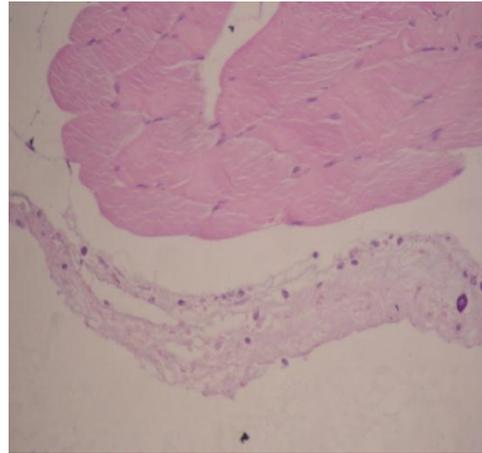
**FIGURAS 4A, 4B e 4C:** Grupos OEAz (4A), Dexa (4B) e Shan (4C), 120 minutos. Nos grupos OEAz e Dexa manutenção de edema, inflamação da fáscia e diminuição da hiperemia. Grupo Shan com células inflamatórias escassas (HE 400x).

Ao exame histológico, quando verificamos aos 120 minutos que é o tempo ápice para a ação inflamatória da carragenina, observou-se células inflamatórias de predomínio linfocíticas, com edema e inflamação da fáscia evidentes, nos grupos 4A e 4B, já no grupo Shan 4C, não se observam mais as características inflamatórias dos anteriores. Já nas 24 horas posteriores, todos os grupos apresentaram reversão do quadro inflamatório (FIGURAS 5A, 5B e 5C).

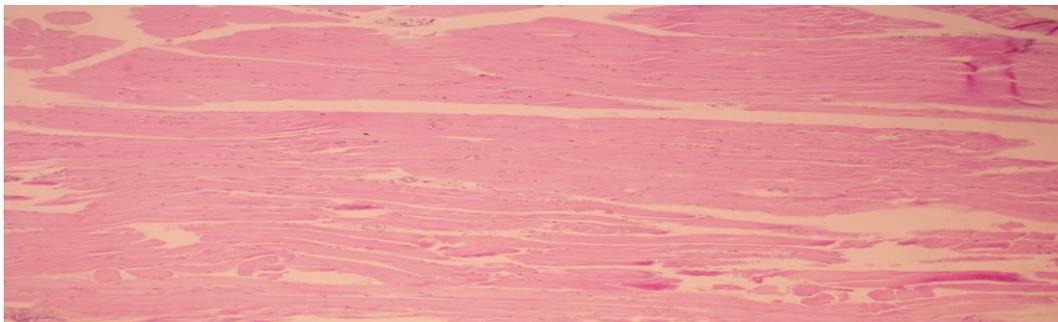
**5A**



**5B**



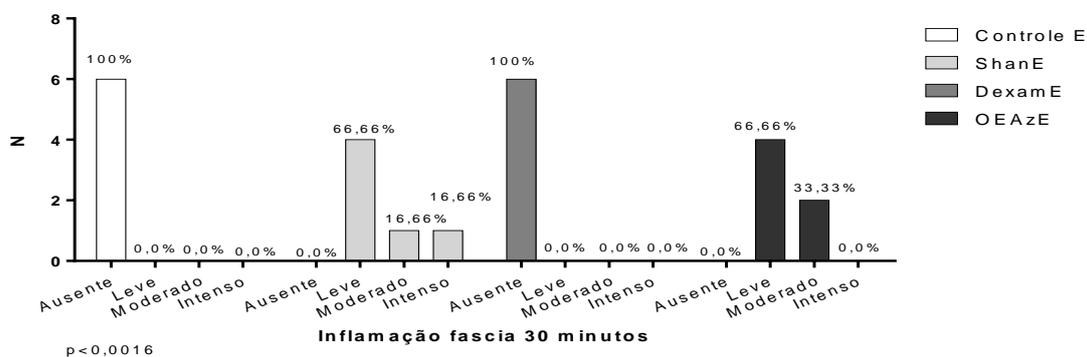
**5C**



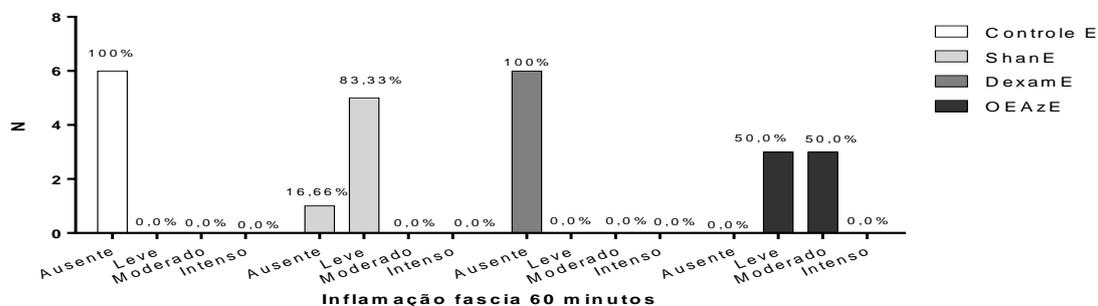
**FIGURAS 5A, 5B e 5C:** Grupos OEAz (5A), Dexa (5B) e Shan (5C). 24 horas. Nos grupos OEAz e Dexa, redução significativa do edema, de células inflamatórias (linfócitos), ausência de miosite. Grupo Shan, livre de células inflamatórias ou qualquer modificação de sua estrutura anatômica normal (HE 400x).

Quando estudada a inflamação da fáscia nos tempos de 30, 60, 120 minutos e 24 horas (FIGURA 6A, 6B, 6C e 6D), demonstrou-se aos 30 minutos (6A) que os grupos Controle e Dexa mantiveram ausentes a inflamação da fáscia (100%), enquanto que nos grupos Shan com presença de inflamação leve (66,66%), moderada (16,66%) e intensa (16,66%) e no OEAz, a inflamação ficou de leve (66,66%) a moderado (33,33%). Aos 60 minutos (6B) permaneceram sem alteração os grupos Controle e Dexa. O grupo OEAz teve sua inflamação classificada igualmente entre leve e moderado e o grupo Shan com melhora do quadro inflamatório, onde 16,66% não apresentaram alteração e 83,33%, apenas com alteração leve.

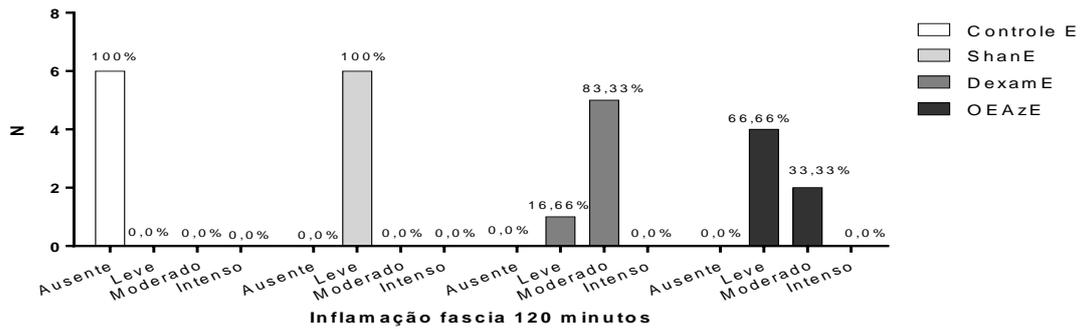
Aos 120 minutos (6C) observa-se que os grupos Controle e Shan estão com ausência total da inflamação enquanto que no Grupo Dexa, foi verificado um aumento do processo com 83,3% sendo moderado e 16,6% leve. Por sua vez o Grupo OEAz apresentou um decréscimo da moderada para 33% e em consequência uma maior migração para inflamação leve (66%). Ao fim das 24 horas (6D), os grupos controle e Shan mantiveram-se inalterados, o Dexa ficando com 100% leve e o OEAz, retornando aos valores iguais do tempo de 60 minutos.



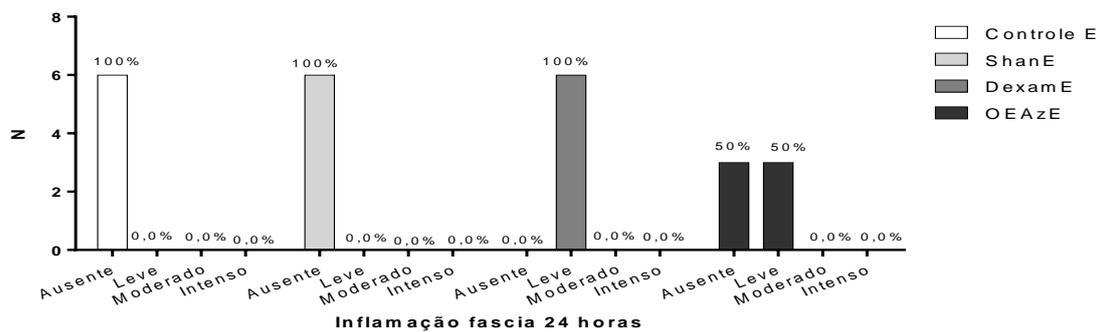
6A



6B



6C



6D

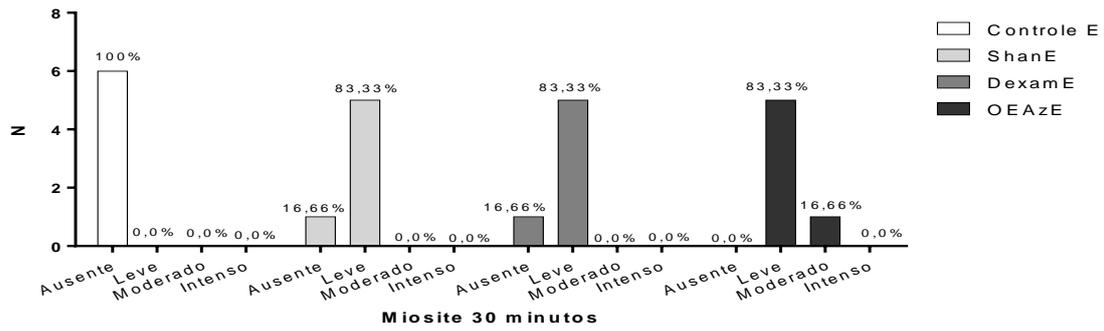
**FIGURAS 6A, 6B, 6C e 6D:** Variação da inflamação da fáscia aos 30, 60, 120 minutos e 24 horas, nos grupos Controle, Shan, Dexa e OEAz.

Em relação à miosite, avaliada nos tempos de 30, 60, 120 minutos e 24 horas (Figuras 7A, 7B, 7C e 7D), aos 30 minutos(7A) observou-se em relação ao grupo Controle, ausência total de miosite. Os grupos Shan e Dexa, apresentaram valores iguais com 16,66% de miosite ausente e 83,33% leve. Já o Grupo OEAz, obteve 83,33% de miosite leve e com miosite moderada, 16,33%.

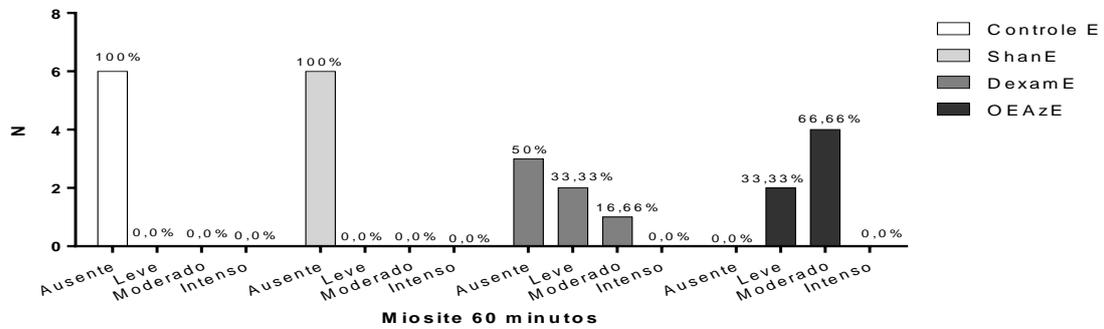
Aos 60 minutos (7B), o Grupo Shan e o Controle, demonstram total ausência de inflamação muscular. Em relação ao Dexa, ocorre uma variação em relação à anterior, 50% mostra-se ausente, 33,33% leve e o restante (16,66%), moderada. O grupo OEAz apresenta 33,33% leve e 66,6% moderada.

Em 120 minutos (7C), os grupos Controle e Dexa estão com ausência de inflamação em 100% das amostras, enquanto que o Shan apresenta 16,6% leve e o restante sem miosite. O grupo OEAz agora apresenta 66,6% leve e 33,3% moderada.

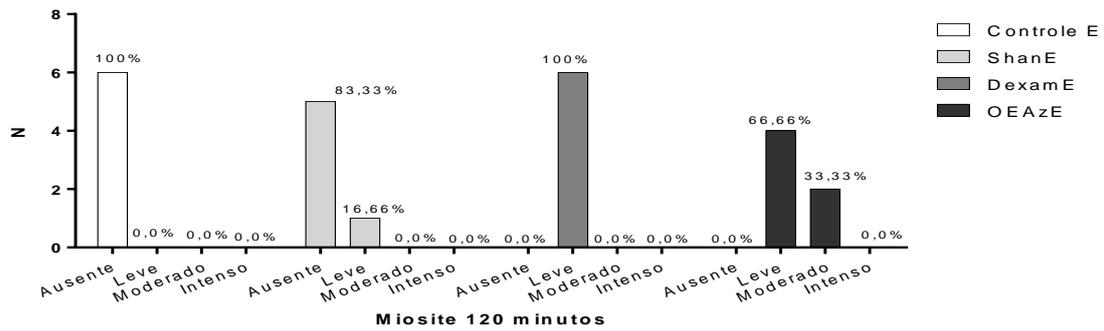
Finalmente após 24 horas, os grupos Controle, Dexa e OEAz ficaram com ausência total de miosite enquanto que o grupo Shan obteve 33,33% de miosite leve e 66,6% sem qualquer inflamação.



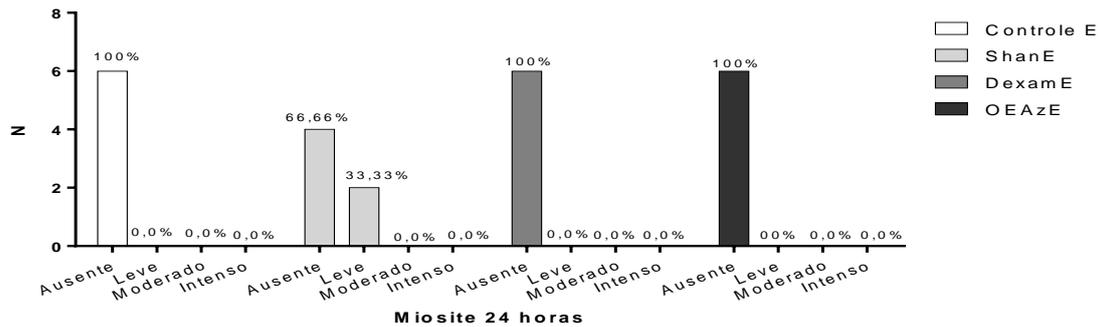
7A



7B



7C



## 7D

**FIGURAS 7A, 7B, 7C e 7D:** Variação percentual da intensidade de miosite nos tempos de 30, 60, 120 minutos e 24 horas, nos Grupos Controle, Shan, Dexa e OEAz.

Quando comparados todos os resultados em 24 horas foi percebido que houve aumento da passada crescente as 24 horas do grupo OEAz de forma semelhante ao grupo controle sadio e com diferença estatística com os grupos Shan e Dexa, demonstrando que em 24 horas o grupo OEAz melhorou satisfatoriamente em relação aos grupos lesionados.

Na rotação das patas foi percebido também melhora do grupo OEAz com maiores médias em relação ao grupo controle sadio. Entretanto os grupos Shan e Dexa apresentaram rotação interna, sendo o grupo Dexa quem mais apresentou rotação interna, demonstrando diminuição do peso corpóreo no lado comprometido compensado o peso para o lado sadio diferentemente do grupo OEAz que melhorou a rotação externa assumindo mais peso corpóreo.

Já em relação a inflamação, nas fásCIAS não mais foi visto em 24 horas nos grupos Controle sadio e Shan, enquanto no grupo OEAz a inflamação foi leve em 50% e no grupo Dexa também foi leve, porém em 100% das observações. E na miosite em 24 horas apenas o grupo Shan apresentou miosite leve em apenas 33%, enquanto todos os demais grupos estavam com ausência de miosite.

Se observado a passada o grupo Dexa apresentou menor passada com menos rotação externa e por vezes apresentando rotação interna que compromete a marcha deixando-a mais compensatória ao mesmo tempo que apresentou leve inflamação. Ao mesmo tempo o grupo OEAz aumentou a passada de forma semelhante ao grupo sadio, melhora desejada da rotação externa em relação à todos os grupos e apenas 50% de inflamação leve e sem miosite.

## 4.2 DISCUSSÃO

As miopatias, caracterizadas pelo processo inflamatório muscular e a conseqüente limitação funcional do membro acometido, levam a um ciclo de pouca inflamação, imobilidade-restrição parcial ou total das atividades de vida diária segundo Barca et al. (2013), o referido ainda relatou que complicações secundárias à miosite, podem levar a óbito (Pneumonia, por exemplo), principalmente pelo enfraquecimento muscular provocado pelo desuso em decorrência do processo inflamatório limitante.

Dimarchkes; Baronn (2012), relatam que na patologia há uma distribuição variável de exsudados inflamatórios no fascículo muscular, impedindo a adequada nutrição muscular e a sua continuidade podendo levar até a necrose do local afetado. Estes dados corroboram com os resultados encontrados quando observadas ao microscópio, os grupos induzidos por carragenina, apresentaram edema, inflamação, acúmulo de células inflamatórias linfocíticas e miosite.

Com relação à carragenina, utilizada neste estudo para induzir a miosite Pinniger (2012), descreveu que realmente a carragenina simula a miosite afetando diretamente a função contrátil, resultando em fraqueza muscular tão comum nas miosites em decorrência a essa inflamação provocada.

Danko (2004) coloca em seu estudo que as miosites, quando em fase de exacerbação são responsáveis por alterações nas condições fisiológicas das musculaturas acometidas e essa continuidade dos episódios inflamatórios leva o indivíduo a alterações e disfunções tanto de mobilidade quanto de reações comportamentais como alteração de humor, quadros depressivos entre outros.

Ainda em relação à mobilidade, quando se verifica o padrão de rotação das patas, segundo Nistala; Wedderburn (2013), quando o indivíduo tem uma lesão em um membro inferior, mesmo inconscientemente, altera seu centro de gravidade para o lado oposto com conseqüente sobrecarga da perna contra-lateral e nesta alteração há uma adaptação do padrão do pé com um aumento da rotação para que outras musculaturas possam auxiliar o movimento. Além disso com a disfunção muscular, há uma tendência a diminuir as passadas uma vez que com o membro afetado o apoio plantar total fica impossibilitado em decorrência da dor.

No estudo quando se comparou o tamanho da passada nos tempos estudados, aos 30 minutos observou-se diferença significativa do grupo Dexa em relação ao OEAz para  $p < 0,05$ . Já após 24 horas ocorre o inverso com uma sobreposição do OEAz x Dexa, para  $p < 0,05$ . Com relação à rotação, após 24 horas, também ocorreu um melhor resultado quando comparado o OEAz com o grupo Dexa para  $p < 0,01$ .

Segundo Khalil et al., (2004), a ação anti-inflamatória e redutora da substância P faz com que a inflamação dure menos tempo e por consequência há um retorno mais rápido à movimentação e amplitudes normais ou muito próximos ao normal. Corroborando ainda com estes dados, em pesquisa de Santos Júnior et al., (2013), em que aplicaram OEAz após tenotomia do tendão calcâneo em ratos, verificou-se que o grupo tratado com o óleo obteve menor intensidade de hemorragia e com melhor resultado na inflamação quando comparado ao grupo controle.

Aos 120 minutos, constatou-se uma diferença significativa do grupo controle em relação ao OEAz, para  $p < 0,01$ , isto corrobora ao estudo de Cicala et al. (2007) que relata o pico de ação da carragenina entre 2 a 4 horas, com a presença marcante dos sinais cardinais da inflamação: edema, hiperalgesia e eritema.

Quando se verifica em relação à inflamação da fáscia, através da microscopia e também aos 120 minutos, notou-se que tanto o Grupo OEAz como o Dexa, apresentaram inflamação leve a moderada, diferindo dos outros grupos estudados, os quais a inflamação estava ausente. Com relação à miosite, no mesmo período, o grupo Dexa sustentou a inflamação leve enquanto que o OEAz se apresentou com 66,6% leve e apenas 33,3% moderado. Quando passadas 24 horas, houve reversão total da miosite tanto no grupo Dexa quanto no grupo OEAz.

Os dados acima são substanciados em pesquisas clínicas realizadas por Koh (2002) e Khalil et al. (2004) que observaram uma atividade inibidora da inflamação mediada pela histamina – responsável pelo aumento da permeabilidade vascular. Esta inibição se dá pelos principais componentes da *Alpinia zerumbet*: o Terpeno-4-ol e o 1,8 cineol. Além disso Bastos et al. (2008) também relata a propriedade anti-inflamatória do 1,8 cineol, detectando a inibição do fator de necrose tumoral e interleucina (IL) 1B, presentes nas manifestações inflamatórias das miosites (SANTOS; RAO, 2000).

Nistala e Wedderburn (2013) relatam quadro algíco exacerbado durante a execução do movimento enquanto na fase ativa da miosite. Como ação antiinflamatória Khalil et al. (2004) relata o terpeno-4-ol principal constituinte do OEAz com essa ação, além de ser redutor da substância P que é responsável pelo controle da dor na medula espinhal.

### 4.3 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observa-se que a aplicação do óleo da *Alpinia zerumbet* em musculatura acometida por miosite foi debeladora do processo inflamatório, melhorando ou reestabelecendo a função do membro acometido. Com o óleo, foi possível debelar totalmente a miosite em 24 horas, resultado semelhante ao grupo dexametasona

O estudo possibilitou comparar um corticóide com a *Alpinia zerumbet* e verificar a sua ação tecidual. Pode-se inferir do texto indícios da possibilidade terapêutica utilizando-se do óleo desta planta, necessitando para tanto de novos e mais abrangentes estudos pré-clínicos.

## REFERENCIAS

1. SOLOMON J.; SWIGRIS J.J; BROWN K. Myositis-related interstitial lunge disease and antisynthetase syndrome. **Journal Brazilian Pneumology**. vol. 37, n.3, p. 100-109. 2011.
2. PIVA, J.A.A.C.; ABREU, E.M.C.; SILVA, V.S.; NICOLAU, R.A. Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: princípios básicos. **Revista Brasileira de Dermatologia**. v.86, n.5, p. 947-954, 2011.
3. TAN J.A.; ROBERTS-THOMSON P.J.; BILIMBERGS P.; HAKENDORT P.; COX S.R.; LIMAYE V. Incidence and prevalence of idiopathic inflammatory myopathies in South Australia: a 30 year epidemiologic study of histology – proven cases, 2009.
4. VICTORIO, C.P.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; LAGE, C.L.S. Chemical composition of the fractions of leaf oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt& R.M. Sm. And antimicrobial activity. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.93, n.4 p.697-701, jul/set. 2009.
5. KHALIL Y; PEARCE A.L; SATKUNANATHAN N; STORER E; FINLAY-JONES J.J; HART P.H. Regulation of Wheal and Flare by Tea Tree Oil: Complementary Human and Rodent Studies. **Journal of Investigate Dermatology**, v. 123, n.4, p. 683-90, 2004.
6. KOH K.J; PEARCE A.L; MARSHMAN G; FINLAY-JONES J.J; HART P.H. Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. **British Journal of Dermatology**, v.147, n.6, p.1212-17, 2002.
7. RIVLIN A.S.; TATOR, C.H. Objective clinical assessment of motor function after spinal cord injury in the rat. **Journal Neurosurg**, v.47, n.3, p.577-581, 1997.
8. BASSO D.M.; BEATTIE B.; BRESNAHAM R. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field test in rats. **Journal of Neurot**, v.12, n.1, p. 1-21, 1995.

9. COSTA A.C. Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome. **Physiologic Behavior.**, v.68 p.211-220. 2009.
10. ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C., BARRETO S.A.L., PIRES, A.J. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red própolis on dermal wound healing in rodent model. **International Journal Morphologie**, v.27, n.1, p.1105-1110, 2009.
11. BARCA E.; AGUENNOUZ M.; MAZZEO A.; MESSINA S.; TOSCANO A.; VITA G.L.; PORTARO S.; PARISI D.; RODOLICO C. ANT1 is reduced in sporadic inclusion body myositis. **Neurological Scient.** V.34, n.3, p.217-224, 2013.
12. DIMACHKIES M.M.; BAROHN R.J. Idiopathic inflammatory miopathies. **Semin Neurol.** v.32, n.3, p. 227-36, 2012.
13. PINNIGER, G.J.; LAVIN, T.; BAKKER A.J. Skelectal muscle weakness caused by carrageenan iduced inflammation. **Muscle and nerve.** v. 46, n.2, p. 413-420. 2012.
14. DANKO, K. Long-term survival of patients with idiopathic inflammatory myopathies according to clinical features: a longitudinal study of 162 cases. **Medicine**, v. 83. P. 35-42. 2004.
15. NISTALA K.; WEDDERBURN L.R. Update in juvenile myositis. **Current Opinion Rheumatologic.** Vol.25, n.6, p.742-46. 2013.
16. CICALA C.; MORELLO S.; ALFIERI A.; VELLESCO V.; MARZOCCO S.; AUTORES G. Haemostatic imbalance following carrageenan – induced rat paw. **European Journal Pharmacology.** v.577 p. 156-61, 2007.
17. SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essencial oils. **Phyto Res**, v.14, n.4 p.240-4, 2000.

## **ANEXOS**

## A – TESTE BBB

Pontuação	Características	Comentário
0	Não se observam movimentos de membro posterior (MP)	
1	Movimentos suaves de 1 ou 2 articulações de membro posterior	Suave – Menor que 50% da capacidade articular
2	Movimento extenso de 1 articulação e possível movimento suave de outra articulação no membro posterior	Extenso – Maior ou igual a 50% capacidade articular
3	Movimento Extenso de 2 articulações do MP	Duas articulações = quadril e joelho, geralmente
4	Movimentos suaves de todas as 3 articulações	Três articulações = quadril, joelho e tornozelo
5	Movimentos suaves de 2 articulações, extenso da 3ª articulação do MP	
6	Movimentos extensos de 2 articulações e movimento delicado da 3ª articulação do MP	3ª articulação = tornozelo
7	Movimentos extensos das 3 articulações	
8	Movimentos suaves, sem suportar o peso do corpo ou a pata apoiada sem suportar o peso do corpo	Extensão rítmica de 3 articulações do membro posterior, o tronco se encontra de lado
9	Apoio plantar com suporte do peso do corpo imóvel ou ocasional, frequente ou consistente suporte do peso do corpo com apoio dorsal	Suporte do peso = contração do músculo. Extensão do membro posterior durante o apoio plantar da pata ou elevação da bacia imóvel
10	Passo sustentando o peso do corpo ocasionalmente, sem haver coordenação entre os membros anterior e posterior	Ocasionalmente > 5º e menor ou igual que 50%. Passos – contato plantar com suporte do peso, o membro posterior avança para restabelecer contato plantar. Coordenação – movimentos simultâneos entre o membro posterior e o membro anterior, alternando entre os lados.

Pontuação	Características	Comentário
0	Não se observam movimentos de membro posterior (MP)	
1	Movimentos suaves de 1 ou 2 articulações de membro posterior	Suave – Menor que 50% da capacidade articular
2	Movimento extenso de 1 articulação e possível movimento suave de outra articulação no membro posterior	Extenso – Maior ou igual a 50% capacidade articular
3	Movimento Extenso de 2 articulações do MP	Duas articulações = quadril e joelho, geralmente
4	Movimentos suaves de todas as 3 articulações	Três articulações = quadril, joelho e tornozelo
5	Movimentos suaves de 2 articulações, extenso da 3ª articulação do MP	
6	Movimentos extensos de 2 articulações e movimento delicado da 3ª articulação do MP	3ª articulação = tornozelo
7	Movimentos extensos das 3 articulações	
8	Movimentos suaves, sem suportar o peso do corpo ou a pata apoiada sem suportar o peso do corpo	Extensão rítmica de 3 articulações do membro posterior, o tronco se encontra de lado
9	Apoio plantar com suporte do peso do corpo imóvel ou ocasional, frequente ou consistente suporte do peso do corpo com apoio dorsal	Suporte do peso = contração do músculo. Extensão do membro posterior durante o apoio plantar da pata ou elevação da bacia imóvel
10	Passo sustentando o peso do corpo ocasionalmente, sem haver coordenação entre os membros anterior e posterior	Ocasionalmente > 5º e menor ou igual que 50%. Passos – contato plantar com suporte do peso, o membro posterior avança para restabelecer contato plantar. Coordenação – movimentos simultâneos entre o membro posterior e o membro anterior, alternando entre os lados.

