

# AVALIAÇÃO DE MÉTODO DIGITAL PARA ANÁLISE DO ÍNDICE FUNCIONAL DO CIÁTICO EM RATOS

## EVALUATION OF DIGITAL METHOD FOR ANALYSIS OF THE SCIATIC FUNCTIONAL INDEX IN RATS

Rafael FRANCO<sup>1</sup>; Soraia da Silva RAIMUNDO<sup>1</sup>; Marco Antonio de Andrade BELO<sup>2</sup>;  
Flávio Ruas de MORAES<sup>3</sup>; Francisco Claudio Dantas MOTA<sup>2</sup>;  
Luana Alexandra FATORETTO<sup>4</sup>

1. Discentes do Curso de Fisioterapia, Universidade Camilo Castelo Branco – UNICASTELO, Descalvado, SP, Brasil. 2. Médico Veterinário, Professor, Doutor, Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Animal, Curso de Medicina Veterinária-UNICASTELO, Descalvado, SP, Brasil. [maabelo@hotmail.com](mailto:maabelo@hotmail.com). 3. Médico Veterinário, Professor titular, Doutor, Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária - FCAV- UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil. 4-Discente do Curso de Medicina - UNICASTELO, Descalvado, SP, Brasil

**RESUMO:** Este trabalho teve como objetivo o estudo da reprodução e descrição de técnica para colheita digital de imagens durante a marcha de ratos e determinação do Índice Funcional do Ciático (IFC), através de uma passarela de vidro e obtenção de imagens com uma câmera digital. Após lesão por estrangulamento controlado de nervo ciático, na extensão de 3mm, durante 30 segundos, utilizando pinça hemostática, um grupo de 32 ratos foram amostrados 24h antes da lesão que serviu de controle e 24h, 7, 14 e 21 dias após a compressão do nervo ciático. Estes ensaios consistiam na filmagem da marcha de cada animal em vista inferior (através de um espelho a 45°), e posteriormente analisadas através do programa IMAGE-J. As medidas retiradas foram os comprimentos das patas (direita e esquerda posteriores), bem como, a distância entre os artelhos. Na análise do IFC, valores próximos do “zero” (0) sugerem que a função do nervo Ciático mantém-se preservada e valores próximos de “menos cem” (-100) indicam perda total de função. Verificou-se neste estudo que 24 horas antes da cirurgia causadora da lesão, a média do IFC foi de  $-7,07 \pm 7,88$  e 24 horas após a lesão estes valores passaram para uma média de  $-77,95 \pm 13,81$ , sendo cerca de 10 vezes maiores, em que 78% dos animais apresentavam de 60 a 100% de perda funcional na atividade motora que demonstrou recuperação gradativa ao longo dos dias analisados, comprovando a acuidade e eficácia da metodologia proposta. Tais resultados sugerem que estudos possam ser conduzidos de forma mais simples e barata com a técnica de obtenção e manipulação de imagens digitais das pegadas, durante a marcha de ratos em laboratório.

**PALAVRAS-CHAVE:** Índice funcional do ciático; ratos; axoniotmese; lesão nervosa periférica.

## INTRODUÇÃO

Animais acometidos por lesão em nervo periférico apresentam alterações funcionais tanto sensitivas como motoras que devem ser adequadamente tratadas, possibilitando assim a diminuição de perdas funcionais e visando proporcionar uma melhor qualidade de vida aos mesmos (ROCHKIND et al., 2007; REIS et al., 2009; BELCHIOR et al., 2009)

Diversos estudos propuseram a utilização de modelos experimentais de lesão nervosa periférica, a maioria deles por estrangulamento controlado do nervo ciático, tanto para estudar o mecanismo da lesão quanto para entender sua regeneração e recuperação funcional (CAMARGO, COSTA, ANDRÉ, 2006; RASO, BARBIERE, MAZZER, 2006; COSTA, CAMARGO, ANDRÉ, 2008; REIS et al., 2008). Estas lesões podem ser realizadas através de vários procedimentos, tais como: compressão do nervo, transecção, estiramento e congelamento. Diversos fatores como a magnitude, a duração e o mecanismo de cada método utilizado

para a realização de cada trauma são fatores importantes para determinar o grau da lesão (HOELLER, ANDRÉ, 2007; BELCHIOR et al., 2009).

Porém, segundo Costa, Camargo e André (2008) um dos maiores desafios encontrado por pesquisadores preocupados em estudar a deambulação de animais de laboratório está na seleção dos métodos de avaliação apropriados, fidedignos e fáceis de reproduzir. A recuperação do nervo lesionado tem sido assim estudada por uma grande variedade de técnicas. Entre estas técnicas a mais importante é aferir o grau de recuperação funcional, proposta por Medinacelli et al (1982) que desenvolveram um método quantitativo para analisar o desempenho dos membros posteriores de ratos, examinando suas pegadas, conhecido como Índice Funcional do Ciático. De acordo com estes autores, os ratos devem ser colocados em um corredor com uma gaiola escura no fim. Uma lâmina de filme de raio-x não exposto e colocado no fundo (chão) e as patas traseiras são mergulhadas em um prato plano contendo revelador. As pegadas

impressas aparecem imediatamente no filme e são perenes. A partir destas pegadas, seis variáveis são medidas: O comprimento de cada pata (direita e esquerda), distância entre o primeiro artelho ao quinto, e distância entre o segundo e o quarto artelho, também em ambos os lados. Porém, esta técnica já vinha sendo questionada, pois são necessárias inúmeras repetições dos procedimentos inerentes, mesmo assim, resultando muitas vezes em impressões indesejáveis com excesso de revelador ou padrões de deambulação que comprometiam a boa qualidade do material a ser analisado.

Reis et al. (2008) salientaram em seus estudos a importância do desenvolvimento de técnicas que utilizem a captura e análise digital de imagens para a avaliação de disfunções nervosas periféricas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo estudar a reprodução e descrição de técnica para colheita digital de imagens, durante a marcha de ratos e determinação do Índice Funcional do Ciático (IFC), através de uma passarela de vidro e obtenção de imagens com uma câmera digital, analisadas em programa IMAGE-J, a fim de se verificar a aplicabilidade prática da metodologia proposta e levantar dados que confirmem sua confiabilidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Animal, Universidade Camilo Castelo Branco, Campus de Descalvado-SP, em concordância com protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética Institucional (Processo: 1777-2007/08), sendo utilizado 32 ratas da linhagem Wistar com peso médio de 230g, acondicionadas em caixas polipropileno, forradas com cepilho e mantidas à temperatura ambiente com renovação de ar permanente e fotoperíodo natural, recebendo água e ração *ad libitum*.

Os animais foram criteriosamente selecionados em geração F1 de matrizes provenientes do Biotério Central da Unesp de Botucatu, sendo obtidos de parições com intervalo de uma semana, mantendo a uniformidade dos grupos para realização do estudo.

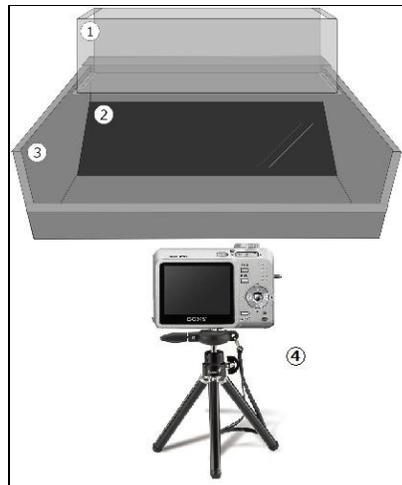
Para a realização da lesão por esmagamento do nervo ciático, os animais foram anestesiados através de uma associação de 0,2% do peso corporal de Ketamina a 5% e 0,07% do peso corporal de Xilazina 2%, por via intramuscular. Durante o

período da anestesia, foi realizada a tricotomia da face lateral da coxa esquerda, indo desde a altura de trocânter maior até o joelho. O animal foi posicionado em decúbito ventral, prendendo suas patas dianteiras e traseiras em abdução e no local foi realizada a assepsia com uma solução de álcool iodado a 20%. Após a verificação do estado de consciência do animal (pinçamento da calda e pregas interdigitais), procedeu-se a uma incisão curvilínea no lado esquerdo da fáscia (aponeurose), iniciando acima e medialmente ao grande trocânter, terminando na coxa, ao nível da inserção do músculo grande glúteo, fazendo o afastamento do mesmo e expondo o nervo ciático. O estrangulamento controlado do nervo ciático foi executado em todos os animais pelo mesmo indivíduo, através de uma pinça hemostática, proporcionando uma pressão estática em um seguimento de 03mm durante 30 segundos. Após a retirada do dispositivo, a ferida foi suturada com pontos simples de nylon monofilamento, e realizada a assepsia da região com uma solução de álcool iodado. (HOELLER, ANDRÉ, 2007).

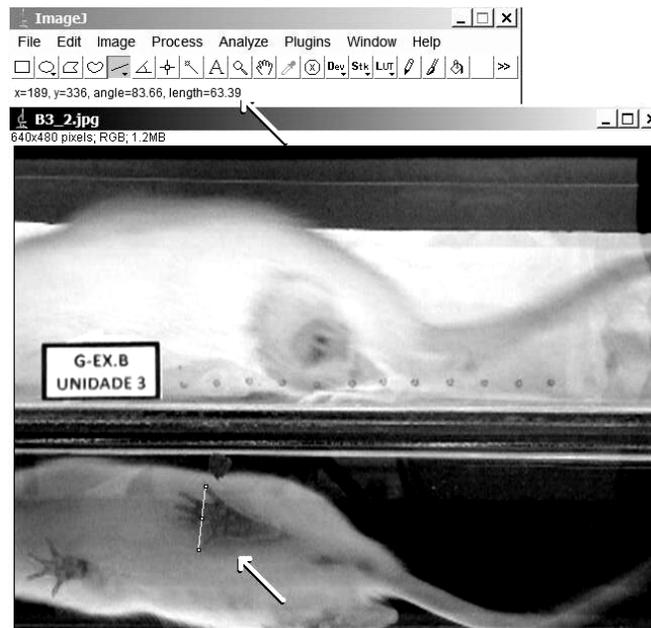
Para a análise funcional da marcha utilizou-se uma passarela confeccionada em vidro, nas seguintes dimensões: 42cm de comprimento, 8,5cm de largura e 9cm de altura aberto nos dois lados entrada e saída. No final da passarela foi acoplada uma caixa escura afim de que os animais corressem em direção para se refugiar. Esta passarela foi acoplada numa estrutura em madeira do tipo MDF onde abaixo, foi adaptado um espelho inclinado a 45° para que fosse possível a captura de imagens no plano inferior como mostra a Figura 1.

Em concordância à metodologia descrita por Costa, Camargo, André (2008), as imagens de vídeo foram lançadas no computador através de cabos apropriados e importadas para serem capturadas as "frames" (quadros isolados) das fases da marcha para posterior mensuração.

O software utilizado para capturar as frames foi o Microsoft® Windows® Movie Maker, Versão 5.1, disponível em computadores com o sistema operacional Windows® XP. Após isso, as frames de interesse foram salvas e exportadas para o programa ImageJ (Versão 1.3, National Institute of Health, 2003) (Figura 2) a fim de serem calculados os parâmetros PL, TS e IT (do IFC), todos durante a fase de apoio imediato da pata. Os valores do IFC abaixo de zero mostram comprometimento funcional e próximos de -100 configuram perda de função total (MEDINACELLI et al., 1982).



**Figura 1:** Circuito para ensaio de marcha e coleta das imagens em que: 1 – Passarela de vidro; 2 – Espelho alojado abaixo numa inclinação de 45°; 3 – Caixa confeccionada em madeira; 4 – Câmera e tripé para obtenção das imagens.



**Figura 2.** Software Image J - Frame onde está sendo calculada as distâncias entre o 1° ao 5° artelho da pata sadia em um dos animais.

A fórmula utilizada para calcular o IFC foi a seguinte:

$$\text{Índice Funcional do Ciático (IFC)} = -38,3 \frac{(EPL - NPL)}{NPL} + 109,5 \frac{(ETS - NTS)}{NTS} + 13,3 \frac{(EIT - NIT)}{NIT}$$

Em que: EPL = comprimento da pegada da pata experimental;

NPL = comprimento da pegada da pata normal;

ETS = distância entre o primeiro e o quinto artelho da pata experimental;

NTS = distância entre o primeiro e o quinto artelho da pata normal;

EIT = distância entre o segundo e o quarto artelho da pata experimental;

NIT = distância entre o segundo e o quarto artelho da pata normal.

Os dados observados para o IFC foram analisados estatisticamente em um delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se o programa Statistical Analysis System (SAS, 2001) em procedimento ANOVA. A comparação entre as médias foi realizada em um Teste T pareado de acordo com Snedecor, Cochran (1980).

## RESULTADOS

A análise do IFC foi realizada 24h após a cirurgia causadora da lesão, mostrando uma perda funcional média de aproximadamente 70,87% quando comparada ao valor referência de -7,08 determinado para o IFC 24 horas antes do início do estudo, resultante de alterações nos padrões de

marcha dos animais estudados (Tabela 1). No entanto, verificou-se diminuição gradativa ( $P < 0,05$ ) no IFC ao longo do experimento, sendo observado valores médios de -77,95% com um dia após a lesão, -55,45% com 7 dias, -12,98% com 14 dias e -9,59% com 21 dias. Tais resultados demonstram a acuidade da metodologia, sendo capaz de aferir e avaliar a recuperação nervosa periférica dos animais, refletida diretamente sobre a marcha dos mesmos.

Outro dado relevante foi constatado na análise realizada no 21º dia após a compreensão do nervo ciático, pois o IFC observado nos animais (-9,59%) foi estatisticamente semelhante aos valores de -7,08% determinados para o IFC dos ratos 24 horas antes da cirurgia (Tabela 1).

**Tabela 1** - Valores médios (n=32) com respectivos desvios-padrão e análise variância<sup>1</sup> para o índice funcional do ciático em ratos Wistar, analisados ao longo do tempo, por metodologia digital<sup>2</sup>, após lesão por esmagamento do nervo ciático.

| Índice Funcional do Ciático (IFC)     | Período Experimental      |                             |                             |                             |                           |
|---------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
|                                       | 24 horas antes (Controle) | 24 depois                   | 7 dias depois               | 14 dias depois              | 21 dias depois            |
| Valor Observado                       | -7,08 ± 7,88 <sup>A</sup> | -77,95 ± 13,81 <sup>C</sup> | -52,45 ± 20,64 <sup>B</sup> | -12,98 ± 13,02 <sup>A</sup> | -9,59 ± 9,21 <sup>A</sup> |
| Valor de Perda Funcional <sup>3</sup> | —                         | -70,87 ± 17,56              | -45,85 ± 24,65              | -6,37 ± 16,14               | -2,99 ± 13,65             |

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo Teste T pareado ( $P < 0,05$ )

<sup>2</sup> Programa Image J (Versão 1.3, National Institute of Health, 2003).

<sup>3</sup> Subtração do valor de IFC observado - valor de IFC controle.

A Tabela 2 demonstra a distribuição do percentual de perda funcional observado nos 32 animais amostrados ao longo do experimento, sendo constatado que 78% dos animais apresentavam de 60 a 100% de perda no IFC 24 horas após a lesão, ocorrendo recuperação gradativa, caindo para 34% com 7 dias e zerando nos dias subsequentes. Da mesma forma, verificou-se 100% de animais com IFC menores que -40 no 14º e 21º dias após a

indução da lesão nervosa, sendo que no último dia analisado 88% dos animais apresentaram IFC menores do que -20, se aproximando dos valores determinados como referência 24 horas antes da cirurgia. Tais resultados seguem a mesma tendência observada na Tabela 1, demonstrando a eficácia da metodologia digital para o estudo de alterações motoras periféricas.

**Tabela 2** - Distribuição percentual dos ratos de acordo com a perda funcional, observada pelo Índice Funcional do Ciático<sup>1</sup>, após indução de lesão nervosa.

| Índice Funcional do Ciático (IFC) <sup>1</sup> | Percentual de ratos por perda funcional |           |               |                |                |
|--|---|-----------|---------------|----------------|----------------|
|  | 24 horas antes (Controle)               | 24 depois | 7 dias depois | 14 dias depois | 21 dias depois |
| de 0 a -20                                     | 97                                      | 0         | 4             | 75             | 88             |
| de -20 a -40                                   | 3                                       | 3         | 21            | 25             | 13             |
| de -40 a -60                                   | 0                                       | 19        | 42            | 0              | 0              |
| de -60 a -80                                   | 0                                       | 50        | 17            | 0              | 0              |
| de -80 a -100                                  | 0                                       | 28        | 17            | 0              | 0              |

<sup>1</sup> Em concordância ao método quantitativo preconizado por Medinacelli et al (1982).

## DISCUSSÃO

Segundo os estudos de Medinacelli et al.(1982), que desenvolveram a teoria do IFC, os valores deste parâmetro devem variar em torno de 0(zero) como padrão de normalidade à -100 (Cem Negativo) como valor máximo de perda funcional. Neste estudo, os animais apresentavam valor médio de -7,07 quando analisados 24 horas antes da indução da lesão nervosa no ciático, ou seja, perto da normalidade; e 24 horas após a lesão valor médio de -77,95, aproximando-se do valor de perda total de função, demonstrando uma correlação positiva à avaliação analógica descrita inicialmente por estes autores.

De acordo com Taczare et al. (2007), na lesão por estrangulamento controlado de nervo ciático ocorrem alterações no transporte axonal de informações, provenientes do sistema nervoso central para sistema nervoso periférico e no sentido contrário, portanto prejudicando a função dos nervos, até que seja realizada sua regeneração completa. No processo compressivo aplica-se sobre o nervo periférico uma força deformante intensa e abrupta, levando somente a um bloqueio fisiológico da condução nervosa, sem ruptura da continuidade axonal, podendo este ser reversível. Medinacelli et al.(1982) e Gasparini, Barbieri, Mazzer (2007), empregando técnica de análise funcional da marcha, observaram que a recuperação de nervos ciáticos estrangulados ocorria do 16º ao 20º e 14º ao 21º dias após a lesão, respectivamente, estabelecendo este procedimento lesivo como um modelo útil para o estudo de regeneração dos nervos periféricos. Em concordância a estes autores, constatou-se nos achados deste ensaio experimental recuperação dos animais entre o 14º ao 21º dias após a lesão, corroborando a hipótese de que o modelo do estrangulamento do nervo ciático consiste numa metodologia eficaz para estudos relacionados a lesão nervosa periférica. Outro aspecto relevante refere-se à capacidade da técnica digital proposta por Costa, Camargo, André (2008) em determinar a recuperação da atividade motora dos animais, pois

foi observado recuperação gradativa ao longo dos dias analisados, demonstrando a acuidade e eficácia da mesma.

Para Gasparini, Barbieri, Mazzer (2007) e Costa, Camargo, André (2008), a validade da metodologia das pegadas sobre papel radiográfico tem sido questionada, pois são necessárias inúmeras repetições dos procedimentos inerentes, principalmente por conta da recorrente produção de artefatos indesejáveis à boa avaliação das imagens, como por exemplo, o aparecimento de borrões e manchas, principalmente durante os estágios iniciais da lesão. Em estudo comparativo entre técnica analógica e digital, Costa, Camargo, André (2008) concluíram que apesar da análise analógica da marcha ser de fácil aplicação e implicar em custos reduzidíssimos, mensurações precisas da função motora são frequentemente impossíveis de serem realizadas, requerendo maior tempo para coleta dos dados, assim como, maior número de repetições. Por outro lado, a análise digital permite realizar avaliações dinâmicas de todo o processo de deambulação de roedores, embora haja a necessidade fundamental dos animais serem rigorosamente treinados a caminharem pela passarela para a captação das imagens, estas se mostram muito mais eficazes que as análises analógicas, visto que as digitais estão imunes aos artefatos indesejados.

Verificou-se neste estudo, que a técnica de colheita digital de imagens proposta por Costa, Camargo, André (2008), para se calcular o IFC pode ser aplicada de forma prática e barata. Assim, por intermédio da análise digital que propusemos estudar neste experimento, é possível se realizar avaliações dinâmicas na marcha dos ratos. Apesar da escolha de lesão por axoniotmese, a técnica de análise digital apresenta potencial para ser empregada também, em outros modelos de lesão, utilizados para o estudo das repercussões de diferentes fatores que comprometem a função motora, tornado-se esta uma ferramenta útil para avaliação da capacidade de recuperação neuromuscular periférica.

---

**ABSTRACT:** This work aimed to study the reproduction and description of technique for digital sampling images during rats gait and determination of the sciatic functional index (SFI), through a glass walkway to obtain shoots with a digital camera. After controlled injury by strangulation of sciatic nerve, with 3mm of length, during 30 seconds, using hemostatic forceps, a group of 32 rats was performed 24 hours before the lesion which served as control and 24 hours, 7, 14 and 21 days after injury. The tests consisted in the filming and shooting each animal in order to observe the view from below (by a mirror to 45°) and subsequently analyzed using the IMAGE-J program. Measures were taken from the lengths of the legs (right and left), and the distance between the ankle. In the analysis of IFC, values close to zero (0) suggest that the function of the sciatic nerve is still preserved and values coming from "less one hundred" (-100) indicate total loss of function. It was verified in this study that 24 hours before surgery the average SFI was  $-7.07 \pm 7.88$  and 24 hours after injury these values rose to an average of  $-77.95 \pm 13.81$ , being about 10 times larger, where 78% of the animals

showed 60 to 100% of functional loss in motor activity, demonstrated by the gradual recovery over the days analyzed, confirming the accuracy and effectiveness of the proposed methodology. These results suggest that studies can be conducted to simplify and reduce costs using the technique for digital images of footprints during rats gait in the laboratory.

**KEYWORDS:** Sciatic functional index. Rat. Axoniotmese. Peripheral nerve injury.

---

## REFERENCIAS

BELCHIOR, A. C. G.; REIS, F. A.; NICOLAU, R. A.; SILVA, I. S.; PEREIRA, D. M.; CARVALHO, P. T. C. Influence of laser (660nm) on functional recovery of the sciatic nerve in rats following crushing lesion. **Laser in Medical Science**. London, v. 24, 893-899, 2009.

CAMARGO, V. M; COSTA J; ANDRE E. S. Estudo comparativo entre dois tipos de raio Laser de baixa potência e seus respectivos efeitos sobre a regeneração nervosa periférica. **Revista Fisioterapia em Movimento**. Curitiba, v. 19, p. 127-134, 2006.

COSTA J; CAMARGO V. M; ANDRE E. S. Proposta de um método de baixo custo para avaliação da marcha em ratos. **Revista Fisioterapia em Movimento**. Curitiba, v. 21, n. 2, p. 115-123, 2008.

GASPARINI, A. L. P; BARBIERI, C. H; MAZZER, N. Correlação entre diferentes métodos de avaliação entre diferentes métodos de avaliação funcional da marcha de ratos com lesão por esmagamento do nervo isquiático. **Acta Ortopédica Brasileira**. São Paulo, v. 15, n. 5, p. 285-289, 2007.

HOELLER, A. A; ANDRÉ, E. S. Efeitos do Laser de baixa intensidade HeNe sobre a atividade eletrográfica do músculo gastrocnêmio de ratos Wistar submetidos à lesão de nervo ciático. **Fisioterapia Brasil**. São Paulo, v. 3, n. 2, p. 33-41, 2007.

LANA, G. C; ANDRE, E. S. Investigação comparativa entre a laserterapia e a estimulação elétrica muscular sobre a regeneração nervosa periférica em ratos Wistar. **Dynamis**. Blumenau, v. 13, p. 113-119, 2007.

MEDINACELLI, L; FREED, W. J; WYATT, R. J. An Index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Experimental Neurology**. Amsterdam, v. 77, p. 634-643, 1982.

RASO, V. V. M.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Índice funcional do ciático nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos. Avaliação da reprodutividade do método entre examinadores. **Acta Ortopédica Brasileira**. São Paulo, v. 14, n. 3, p. 133-136, 2006.

REIS, F. A.; BELCHIOR, A. C.G; NICOLAU, R. A; FONSECA, T. S; CARVALHO, P. T. C. Efeito da terapia com laser de arsenieto de gálio e alumínio (670nm) sobre a recuperação do nervo ciático de ratos após lesão por neurotmese seguida de anastomose epineural: análise funcional. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. São Carlos, v. 12, p. 215-222, 2008.

REIS, F.A.; BELCHIOR, A. C. G.; CARVALHO, P. T. C.; SILVA, B. A. P.; PEREIRA, D. M.; SILVA, I. S.; NICOLAU, R.A. Effect of laser therapy (660nm) on recovery of the sciatic nerve in rats after injury through neurotmesis followed by epineural anastomosis. **Lasers in Medical Science**. London, v. 24, p. 741-747, 2009.

ROCHKING, S.; TREJO, L. L.; NISSAN, M.; SHAMIR, M. H.; KHARENKO, O.; ALON, M. Efficacy of 780nm laser phototherapy on periphera procedure regeneration after neurotube reconstruction procedure. **Photomedicine and Laser Surgery**. New Rochelle, v. 25, n. 3, p. 137-143, 2007.

**SAS (Statistical Analysis System)** Institute Inc. SAS/STAT software changes and enhancements through computer program. Release 8.2. Cary: SAS Institute; 2001.

SNEDECOR, G. W; COCHRAN, W. G; 1980. **Statistical Methods**. Iowa State University Press, Ames, USA, 75p.

TAKZARE, N.; HOSSEINI, M.; BARBARESTANI, M.; BAKHTIARIAN, A.; FOROUTAN, H. R.; MONTAZERI, B.; KANGARLOU, H. R.; TAKZARE, A. Improved regeneration of injured sciatic nerve of rats by He-Ne Laser. **Journal of Medical Sciences**, Faisalabad, v. 7, n. 8, p. 1354-1357, 2007.