

ÍNDICE FUNCIONAL DO CIÁTICO NAS LESÕES POR ESMAGAMENTO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS. AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE DO MÉTODO ENTRE EXAMINADORES

SCIATIC FUNCTIONAL INDEX IN SMASHING INJURIES OF RATS' SCIATIC NERVES. EVALUATION OF METHOD REPRODUCIBILITY AMONG EXAMINERS

VANESSA VILELA MONTE-RASO¹, CLÁUDIO HENRIQUE BARBIERI², NILTON MAZZER³

RESUMO

Foi avaliada a reprodutibilidade inter-pessoal do método de avaliação do Índice Funcional do Ciático (IFC), medido por um programa de computação desenvolvido para este fim. Foram empregados 20 ratos Wistar, cujo nervo ciático direito era abordado sob anestesia geral e esmagado num segmento de 5 mm proximal à sua trifurcação com um dispositivo especial, com carga fixa de 5 Kg por 10 minutos. Impressões das pegadas dos animais foram obtidas na fase pré-operatória e, depois, semanalmente, da 1ª à 8ª semana, em uma pista de marcha. As impressões eram digitalizadas, armazenadas e avaliadas, pela medida de parâmetros predeterminados, por quatro examinadores, seguindo sempre a mesma seqüência de marcação dos parâmetros. Os resultados foram submetidos a análise estatística, que mostrou haver um alto índice de correlação entre examinadores na avaliação pré-operatória e nas 3ª, 4ª, 5ª, 7ª e 8ª semanas (igual ou maior que 0,82), com queda casual na 6ª semana, mas manteve significativa como as demais ($pF < 0,01$). Na 1ª e 2ª semanas, o índice de correlação foi próximo de zero, mostrando a pouca reprodutibilidade do método nesse período, em que a variabilidade entre os animais não diferiu da variabilidade entre os examinadores ($p=0,24$ e $0,32$, respectivamente), devido à pouca definição das impressões das pegadas.

Descritores: Regeneração; Nervo ciático; Ratos; Avaliação.

SUMMARY

The interpersonal reproducibility of the method for evaluating the Sciatic Functional Index (SFI) was measured by a computer-based program developed for this purpose. Twenty Wistar rats were used, and their right sciatic nerve was addressed using general anesthesia. Those nerves were subsequently smashed in a segment of 5 mm proximal to its trifurcation with a special device, with a fixed load of 5 kg for 10 minutes. Animals' footprints were taken at preoperative phase and then in a weekly basis, from the 1st to the 8th week, in a gait track. Prints were digitalized, stored and assessed by predetermined parameter measures, by four examiners, always following the same sequence of parameters marking. Results were submitted to statistical analysis, which evidenced the existence of a high correlation among examiners at preoperative evaluation and on the 3rd, 4th, 5th, 7th, and 8th weeks (equal or higher than 0.82), with an eventual drop on 6th week, but still as significant as the others ($pF < 0.01$). On the 1st and 2nd weeks, the correlation index was nearly zero, showing the low reproducibility of the method in that period, in which variation among animals did not differ from the variation among examiners ($p=0.24$ and 0.32 , respectively), due to the poor sharpness of footprints.

Keywords: Regeneration; Sciatic Nerve; Rats; Evaluation.

INTRODUÇÃO

Em condições experimentais, a recuperação das lesões nervosas periféricas é estudada principalmente através de técnicas de eletrofisiologia, histologia e morfometria. Embora os parâmetros eletrofisiológicos e morfológicos sejam úteis, é importante conhecer o grau de recuperação funcional que eles implicam. A avaliação funcional de humanos é relativamente fácil, mas de animais é praticamente impossível com os mesmos métodos, o que motivou a busca por métodos específicos em condições experimentais.

Gutmann e Gutmann⁽¹⁾ demonstraram que a perda da capacidade de espalhar os dedos da pata traseira é um parâmetro confiável para avaliar o grau de lesão, bem como para seguir sua recuperação. Seu método, todavia, era muito rudimentar e não permitia quantificar nem uma coisa, nem outra. DeMedinaceli et al.^(2,3) desenvolveram um método quantitativo, confiável e reprodutível da condição funcional do nervo ciático de ratos, para a avaliação do grau de lesão e da recuperação, denominado de Índice Funcional do Ciático, e que foi posteriormente modificado por outros autores^(4,5).

Trabalho realizado no Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Endereço para correspondência : Campus Universitário – CEP: 14048-900 Ribeirão Preto, SP - Brasil - E-mail: vanmonteraso@yahoo.com.br

1) Fisioterapeuta, aluna do Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação.

2) Professor titular (orientador).

3) Professor associado (co-orientador).

Trabalho recebido em: 01/08/05 aprovado em 03/02/06

Um programa de computador (*software*) foi desenvolvido em nosso laboratório*, possibilitando a captura (digitalização com um *scanner*), armazenamento e análise das imagens das pegadas dos ratos, realizando os cálculos segundo as fórmulas matemáticas propostas e fornecendo os resultados dos índices funcionais de DeMedinaceli et al.^(2,3), de Carlton e Goldberg⁽⁴⁾ e de Bain et al.⁽⁵⁾. Este programa foi testado em diversas investigações em nosso grupo^(6,7,8,9), sempre demonstrando estreita correlação entre as alterações morfológicas e morfométricas do nervo ciático e as medidas do IFC, de modo que a perda funcional resultante das lesões produzidas no nervo ciático de rato pode ser monitorizada pelo IFC.

Entretanto, em todas as investigações ficou patente que a marcação dos parâmetros predeterminados nas impressões das pegadas nem sempre é fácil, as dificuldades sendo maiores nas impressões obtidas nas primeiras semanas após a lesão, diminuindo progressivamente à medida que ocorria a recuperação funcional. De modo geral, as impressões obtidas na primeira e na segunda semana mal permitiam definir a pegada, sendo praticamente impossível fazer a marcação dos parâmetros, fato responsável por grande variação nos valores iniciais do SFI, a ponto de lançar dúvida sobre sua confiabilidade nesse período. Foi o objetivo da presente investigação, então, avaliar a reprodutibilidade do método, utilizando vários avaliadores e um novo programa de computador, aperfeiçoado do anteriormente utilizado, procurando estabelecer a correlação interpessoal dos resultados.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 20 ratos machos adultos da linhagem Wistar, com peso corporal variando entre 200 e 300 gramas (média: 250 g), obtidos de um único fornecedor e mantidos em gaiolas coletivas com cinco animais cada, com dieta à base de ração padronizada e água *ad libitum*. Antes de qualquer outro procedimento, os animais eram treinados a caminhar na passarela de marcha construída para esse fim conforme modelo de DeMedinaceli e colaboradores (Figura 1) e, tão logo tivessem aprendido, era obtida a impressão pré-operatória da pegada para cálculo do Índice Funcional do Ciático (IFC) normal.

Procedimento cirúrgico

Os ratos foram anestesiados com uma associação de medicamentos anestésicos (Ketamina 5%, Xilasina 2%, proporção 1:4, 0,13 ml/100 g de peso corporal). O nervo ciático era abordado através de uma incisão cutânea longitudinal retilínea de 3 cm de

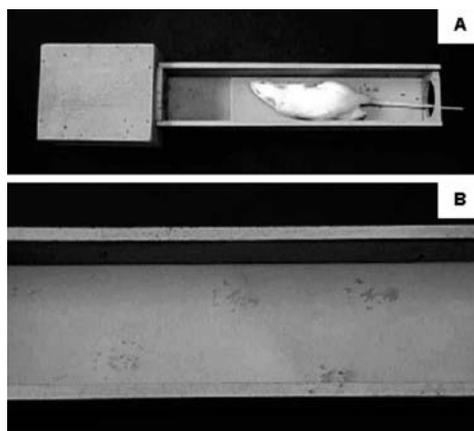


Figura 1 - Registro das pegadas na passarela. Vista geral da Passarela (A). Pegadas registradas (B).

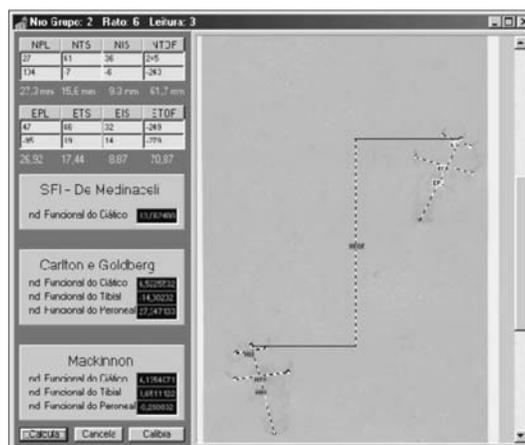


Figura 2 - Visualização do programa utilizado.

então, caminhavam sobre as tiras de papel impregnadas colocadas na passarela e deixavam, em média, três pegadas de cada pata. As tiras contendo as pegadas eram deixadas secar e copiadas em um *scanner* de alta resolução, e as imagens assim digitalizadas eram armazenadas e analisadas no computador, com o programa já mencionado⁽⁶⁾. Os dados referentes a cada animal eram identificados individualmente, de modo a permitir o seguimento ao longo do tempo. Os parâmetros medidos nas impressões tanto das patas normais (N) como das operadas (E) eram o comprimento da pegada (PL, de *print length*, ou distância longitudinal entre a ponta do dedo mais longo e o calcanhar), a abertura total dos dedos (TS, de *toe spread*, ou distância transversal entre o primeiro e o quinto dedos) e a abertura dos dedos intermediários (IT, de *intermediate toes*, ou distância transversal entre o segundo e o quarto dedos). Com a utilização do programa específico de computador (Figura 2), os pontos-chave de cada parâmetro eram simplesmente clicados com o mouse na tela do monitor, numa seqüência previamente estabelecida, e o IFC era automaticamente calculado, incluindo a geração de um gráfico com a curva de regeneração em função do tempo. A fórmula usada nos cálculos do IFC foi a proposta por Bain et al.⁽⁶⁾, como se segue:

$$\text{SFI} = -38,3 \times \frac{\text{EPL}-\text{NPL}}{\text{NPL}} + 109,5 \times \frac{\text{ETS}-\text{NTS}}{\text{NTS}} + 13,3 \times \frac{\text{EIT}-\text{NIT}}{\text{NIT}} - 8,8$$

* Selli, M. Desenvolvimento de um método computadorizado para avaliação funcional das lesões de nervos periféricos através da análise da marcha: modelo experimental em ratos. Dissertação de mestrado. FMRP-USP, Ribeirão Preto, 15 de dezembro de 1998.

As pegadas foram obtidas e analisadas semanalmente, da primeira à oitava semanas pós-operatórias, primeiramente por um examinador experiente com o método e, depois, por três examinadores a quem o método foi minuciosamente ensinado. Cada examinador fazia três avaliações de cada pegada em dias diferentes, extraindo daí um valor médio que era tomado para os cálculos posteriores e para a análise estatística.

Análise estatística

Para a análise estatística dos dados utilizou-se o modelo de efeitos aleatórios⁽¹¹⁾; primeiramente, procurou-se validar o método de avaliação, comparando-se a variação dos valores obtidos entre os ratos, para cada um dos examinadores, com a variação observada para cada rato dentre os examinadores, por meio do teste F com o nível de significância menor que 1% ($p < 0,01$), em cada semana do período total de observação de oito semanas (nove avaliações, incluindo a pré-operatória). Se os valores de um mesmo rato fossem homogêneos para os quatro examinadores, então o método foi considerado eficiente para avaliar a recuperação da lesão. Para complementar esse estudo, calculou-se o coeficiente de correlação intra-classe, o qual mede a intensidade de reprodução de resultados homogêneos; quanto mais próximo da unidade, mais eficiente é o método.

RESULTADOS

Generalidades

Os animais toleraram bem a anestesia e o procedimento cirúrgico. De início, os animais não se apoiavam sobre a pata operada, apresentando o pé caído e os dedos em completa adução, como resultado da grave disfunção do nervo ciático. Eles gradualmente recuperaram a capacidade de fazer apoio sobre o membro operado e espalhar os dedos.

Análise Funcional da Marcha (IFC)

Foram avaliadas 180 (9 x 20) impressões de pegadas, totalizando 720 (4 x 180) avaliações. Na avaliação pré-operatória, o valor médio do IFC medido pelos quatro examinadores nos 20 animais foi de -5,72 (variação: -6,84 a -3,45). As diferenças entre os examinadores não foram significantes no período pré-operatório porém, as medidas correlacionaram entre si, de maneira altamente significativa ($p_F < 0,01$) e o coeficiente de correlação intra-classes (r) foi de 0,84, indicando alta reprodutibilidade do método para os animais intactos (Tabela 1). Na primeira semana pós-operatória, o valor médio do IFC foi de

Tempo	P_f	r
inicial	<0,01	0,84
1ª semana	0,24	0,06
2ª semana	0,32	0,04
3ª semana	<0,01	0,88
4ª semana	<0,01	0,88
5ª semana	<0,01	0,82
6ª semana	<0,01	0,74
7ª semana	<0,01	0,82
8ª semana	<0,01	0,89

Tabela 1 - Valores de p do Teste F (p_f), coeficiente de correlação Intra-classe (r).

-78,88 (variação: -93,91 a -61,55), passando a -77,9 (variação: -96,22 a -62,9) na segunda, -33,72 (variação: -35,47 a -31,89) na terceira, -25,5 (variação: -26,68 a -24,88) na quarta, -21,86 (variação: -22,4 a -21,22) na quinta, -19,79 (variação: -22,8 a -19,19) na sexta, -13,7 (variação: -14,36 a -13,09) na sétima, e -11,46 (variação: -11,86 a -10,94) na oitava.

As diferenças entre os valores medidos pelos examinadores individualmente foram significantes na primeira e na segunda semanas pós operatória, e as medidas não correlacionaram entre si ($p_F = 0,24$ e $p_F = 0,32$, respectivamente), mas não mais em

nenhuma das semanas subsequentes (<0,01) (Tabela 1). O coeficiente de correlação intra-classes foi de 0,06 e 0,04 nas duas primeiras semanas, demonstrando muito baixa correlação entre os valores medidos pelos examinadores. Já nas semanas subsequentes variou de 0,74 a 0,89, demonstrando maior homogeneidade entre as medidas (Figura 3).

DISCUSSÃO

A regeneração de nervos periféricos observada em estudos experimentais apresenta aspectos controversos, porque nem sempre é possível estabelecer uma correlação clara entre os resultados obtidos por diferentes métodos numa mesma investigação, nem entre os resultados obtidos por um mesmo método empregado em investigações diferentes ou conduzidas por autores diferentes. A maioria dos estudos sobre a regeneração dos nervos periféricos emprega métodos histo-morfométricos e eletrofisiológicos, os quais, embora essenciais, não adiantam nenhuma informação sobre a recuperação funcional correspondente, o que seria do maior interesse. Avaliações funcionais são muito difíceis em animais, por motivos óbvios, mas De Medinaceli et al.^(2,3), introduziram o método do IFC de ratos, modificado por outros autores^(4,5) que permite avaliar satisfatoriamente a recuperação do nervo ciático lesado em função do tempo. Estudos anteriormente conduzidos pelo nosso grupo mostraram haver clara correlação entre a regeneração morfológica, avaliada pela morfometria dos nervos, e a recuperação

funcional, medida pelo IFC^(6,7,8,9,12).

Apesar dos empecilhos, o método do IFC parece ser ainda o mais versátil, pois é de fácil aplicação e de custo baixo em relação a outros métodos propostos, prováveis motivos de sua mais ampla aplicação. Brown et al.⁽¹³⁾, realizaram um estudo da confiabilidade do método do IFC, em que quatro examinadores analisaram as medidas em seqüências diferentes

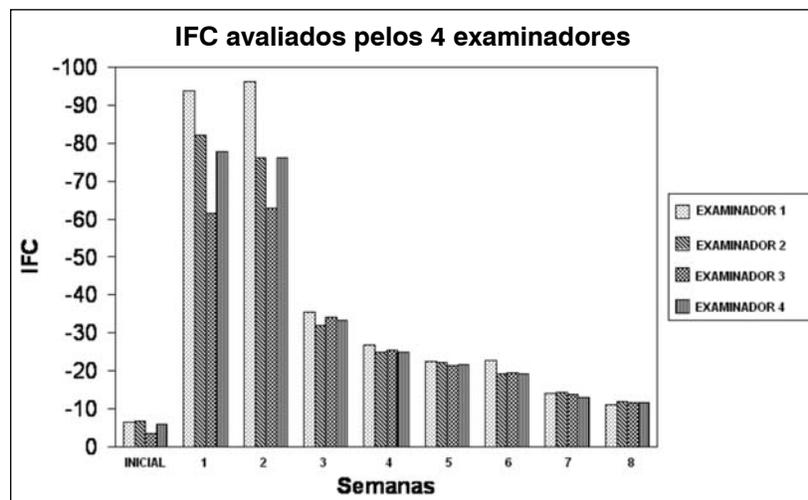


Figura 3 - Avaliação semanal do IFC pelos 4 examinadores.

e em três ocasiões diferentes, concluindo que se trata de um bom método não invasivo. Basso et al.⁽¹⁴⁾, desenvolveram uma escala de avaliação qualitativa (BBB) para avaliar a recuperação após lesão medular; os animais portadores dessas lesões eram deixados livres para caminhar em uma arena, alguns parâmetros sendo utilizados para a qualificação do grau de lesão e da recuperação dos movimentos, mas não se trata de um método quantitativo, como o IFC. Entretanto, já foi demonstrada alta correlação entre o método do IFC e o BBB⁽¹⁵⁾. Varejão et al.⁽¹⁶⁾, desenvolveram um método cinemático quantitativo de avaliação da regeneração nervosa, baseado na medida de um ângulo do pé do animal (TOA, de *toe-out-angle*), usando como pontos de referência o calcâneo e o quinto e o terceiro dedos, conforme avaliados através de análises computadorizadas. Segundo os autores, este método teve boa correlação com o IFC, mas é de difícil aplicação. Bervar⁽¹⁷⁾ comparou um método de avaliação por vídeo-análise com o IFC e também encontrou correlação positiva entre ambos, concluindo, todavia, que o método de vídeo-análise oferece a vantagem de disponibilizar imagens digitalizadas.

Apesar da confiabilidade do método do IFC, em todos os nossos trabalhos anteriores ficou patente a dificuldade de avaliação nas primeiras semanas após a produção da lesão do nervo ciático, porque as impressões das pegadas eram invariavelmente de má qualidade, visto que a paralisia imposta ao membro do animal impedia a pisada bem marcada. Com a regeneração subsequente do nervo e a recuperação funcional do animal, as pegadas tornavam-se mais claras, permitindo a marcação mais adequada dos pontos-chave das pegadas. As dificuldades observadas, então, nas semanas iniciais após a produção da lesão lançaram dúvidas sobre a fidelidade do método nessa fase, motivo da presente investigação.

A metodologia empregada aqui seguiu a mesma linha dos trabalhos anteriores, com o modelo da lesão por esmagamento do nervo ciático, que apresenta a vantagem de preservar pelo menos em parte o arcabouço do nervo e não requerer treinamento específico nem técnicas e materiais de reparo, como no caso da secção seguida de sutura^(2,3,6,7,8,9). A lesão por esmagamento foi produzida em todos os animais com um pinça especialmente confeccionada para esse fim, calibrada regularmente com uma célula de carga; assim, sua aplicação era controlada e a lesão produzida, mais homogênea, semelhante ao que já havia sido obtido nos nossos trabalhos anteriores, com o uso de uma máquina universal de

ensaio, e bem diferente dos métodos descritos por outros autores, com pinças hemostáticas ou de relojoeiro⁽¹⁸⁾. Além disso, as lesões foram produzidas sempre pelo mesmo autor (VVMR), que foi também o primeiro examinador, por ser o mais experiente com o método. Dos outros três examinadores, um já dominava o método, mas os dois restantes não, apesar de terem ampla vivência com o uso de computadores. Para esses, o método foi exaustivamente explicado e a rotina do exame foi demonstrada várias vezes, até que se sentissem seguros para realizá-lo. Além disso, os exames por eles realizados foram observados pelo mais experiente, sem interferência deste, nem mesmo quando um deles incidiu em erro que alterou a média de suas medidas, na sexta semana, causando queda no índice de correlação interexaminadores.

Dentro do rigor da investigação, os resultados obtidos foram altamente confiáveis e confirmaram a suspeita de que a má qualidade das pegadas das duas primeiras semanas praticamente tornava impossível uma avaliação adequada. Tal fato foi evidenciado pela ausência de correlação intra-classes nessa fase, com índices próximo de zero (0,06 e 0,04), muito abaixo dos que se observaram a partir da terceira semana (acima de 0,82). No período pré-operatório, bem como a partir da terceira semana pós-operatória, com a melhor qualidade das pegadas, as avaliações tornaram-se mais fáceis e os valores das medidas, mais homogêneos. Também, a variabilidade entre ratos não diferiu da variabilidade entre examinadores nas duas primeiras semanas ($p=0,24$ e $0,32$, respectivamente).

CONCLUSÃO

Os autores concluem que o método de avaliação funcional experimental pelo Índice Funcional do Ciático, em ratos, é plenamente reproduzível e confiável quando aplicado após a segunda semana da produção de uma lesão por esmagamento do nervo.

Agradecimentos

Agradecemos ao engenheiro Alexandre Yamazita, ao veterinário Giuliano Barbieri, aos meus alunos do curso de fisioterapia da UNIFENAS Ana Paula Ribeiro e Francis Trombini, e ao estatístico Prof. Luiz de Souza, pela valiosa colaboração nas diferentes fases do desenvolvimento do trabalho. Também, ao Prof. José Batista Volpon e aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia da FMRP-USP de Ribeirão Preto, onde foi realizada esta pesquisa, e à CAPES, pela concessão de bolsa de doutorado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gutmann E, Gutmann L. Factors affecting recovery of sensory function after nerve lesion. *J Neurol Psychiatry*. 1942; 5:117-29.
2. De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional conduction of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982; 77:634-43.
3. De Medinaceli L, Derenzo E, Wyatt RJ. Rat sciatic functional index data management system with digitized input. *Comp Biom Res*. 1984; 17:185-92.
4. Carlton JM, Golberg NH. Quantitative integrated muscle function following re-nerve. *Surg Fórum*. 1986; 37:611-12.
5. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter RT. Functional evaluation of complete sciatic peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1989; 83:129-38.
6. Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, Selli M. Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. *J Reconstr Microsurg*. 2001; 17:69-75.
7. Mendonça AC, Barbieri CH, Mazzer N. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. *J Neurosci Methods*. 2003; 129:183-90.
8. De Sá JM, Mazzer N, Barbieri CH, Barreira AA. The end-to-side peripheral nerve repair functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. *J Neurosci Methods*. 2003; 136:45-53.
9. Monte RasoVV, Barbieri CH, Mazzer N, Fasan VS. Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves? *J Neurosci Methods*. 2005; 142: 185-92.
10. Lowdon IMR, Seaber AV, Urbaniak JR. An improved method of recording rat tracks for measurement of the sciatic functional index of De Medinaceli. *J Neurosci Methods*. 1988; 24:279-81.
11. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical methods*. 7th ed. Ames, Iowa :Iowa State University Press; 1980. 507p.
12. Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, Del Bel EA. The use of a muscle graft to repair a segmentary nerve defect in an experimental study using the sciatic nerve of rats as model. *J Neurosci Methods*. 2003; 133: 19-26.
13. Brown CJ, Evane PJ, Mackinnon SE, Bain JR, Makino AP, Hunter DA, Hare G. Inter- and intraobserver reliability of walking-track analysis used to assess sciatic nerve function in rats. *Microsurgery* 1991; 12:76-79.
14. BassoDM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995; 12:1-21.
15. Souza AS, Da Silva CA, Del Bel EA. Methodological evaluation to analyze functional recovery after sciatic nerve injury. *J Neurotrauma*. 2004; 21:627-35.
16. Varejão ASP, Cabrita AM, Geuna S, Pinto PM, Filipi VM, Gramsbergen A, Meek MF. Toe out angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. *Exp Neurol*. 2003; 183:695-99.
17. Bervar M. Video analysis of standing- an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *J Neurosci Methods*. 2000; 102:109-16.
18. Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, Hertl C. Nerve crush injuries: A model for axonotmesis. *Exp Neurol*. 1994; 127:284-90.