
DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE BAIXO CUSTO PARA AVALIAÇÃO DA MARCHA EM RATOS

Development of a low-cost method to analyse gait in rats

Janaína Costa¹, Vanessa Marques e Camargo², Edison Sanfelice André³

¹ Fisioterapeuta, curso de Fisioterapia da Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC – Brasil, (*in memoriam*)

² Fisioterapeuta, curso de Fisioterapia da Universidade Regional de Blumenau. Laboratório de Fisioterapia Neurológica Experimental (LFNE) FURB, Blumenau, SC - Brasil, e-mail: vanessacamargo@yahoo.com.br

³ Professor Doutor Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisioterapia. Laboratório de Fisioterapia Neurológica Experimental (LFNE) FURB, Blumenau, SC - Brasil, e-mail: sanfelice@furb.br

Resumo

Contexto: Dentre os mais desafiadores problemas encontrados por pesquisadores preocupados em estudar a deambulação de animais de laboratório está a seleção de métodos de avaliação apropriados, fidedignos e fáceis de reproduzir. Desde a oitava década do século passado, inúmeras alternativas foram desenvolvidas e validadas, mas que configuram situações pouco práticas ou de alto custo.

Objetivo: O presente artigo descreve o desenvolvimento de um método simples, fácil de usar e de baixo custo para avaliação funcional da marcha de roedores de laboratório. **Métodos:** Dez ratos jovens machos da raça *Wistar* sofreram estrangulamento do nervo ciático e foram avaliados pelo Índice Funcional do Ciático obtido analógica e digitalmente, acompanhado da mensuração digital do ângulo do tornozelo durante a fase de apoio intermediário da pata traseira. Comparações entre as técnicas analógica e digital foram realizadas 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias após a lesão do nervo ciático. **Resultados:** Tanto na análise analógica quanto na digital foi possível observar a recuperação funcional da marcha dos ratos. Apesar disso, a análise digital foi mais acurada, pois não sofreu interferência deletéria de artefatos conspícuos às análises analógicas, permitindo maior precisão na interpretação dos dados. **Conclusão:** Apesar de se ter escolhido um modelo de axonotmese para a testagem das técnicas de análise aqui descritas, é possível sugerir o emprego desse método de análise da marcha em diferentes situações experimentais.

Palavras-chave: Nervo ciático; Locomoção; Regeneração neural; Análise funcional da marcha; Ratos.

Abstract

Background: Among the most challenging problems found by researchers in studying the gait of laboratory animals is the selection of appropriate, reliable and easy to replicate evaluation methods. Since 1980's, countless alternatives were developed and validated, but that configure lesser practical or higher cost situations. **Objective:** The present paper describes the development of a simple, easy to use, low-cost method for functional evaluation of gait patterns in laboratory rodents. **Methods:** Wistar rats (N=10) submitted to a sciatic nerve crush were submitted to the Sciatic Function Index (SFI) under analogical and digital methods, accompanied by digital measurement of the ankle-stance angle (ASA) during the stance phase of the gait. Comparisons between analogical and digital data were made 24 hours, 7, 14, 21 and 28 days after the crush lesion. **Results:** Both analogical and digital analyses revealed functional recovery of the gait of the rats. In spite of that, the digital analysis is more accurate because it did not suffer deleterious interference of the artifacts conspicuous to the analogical one, allowing more precision in the interpretation of the data. **Conclusion:** Regardless of the axoniotmesis model that was used to test the different evaluation techniques described here, this method can be used with reliable results in the study of effects of different experimental conditions of gait mechanisms in rodents.

Keywords: Sciatic nerve; Locomotion; Nerve regeneration; Gait analysis; Rats.

INTRODUÇÃO

Progressos no desenvolvimento de modelos animais para uma série de condições mórbidas requerem testes que sejam suficientemente sensíveis para caracterizar aspectos distintos para cada uma das funções que se deseja estudar. Especificamente, a capacidade regenerativa do sistema nervoso periférico tem sido estudada há longa data (1) e o estrangulamento do nervo ciático de ratos é um modelo bem caracterizado e aceito mundialmente (2). Nesse universo, diferentes propostas são sugeridas, incluindo desde testes que avaliam a sensibilidade somática até aqueles que visam a avaliar a coordenação motora (3).

Por conta das características morfológicas e estruturais, o sistema nervoso periférico está sujeito a uma série importante de situações agressivas que levam, invariavelmente, a lesões de diferentes graus (4). A recuperação do nervo lesionado tem sido estudada por uma grande variedade de técnicas. Dessas, inclui-se a eletrofisiologia do nervo e do músculo, testes clínicos, mensurações do transporte axonal e histologia neuronal (5, 6, 7). O critério mais importante, entretanto, é o grau de recuperação funcional (8). Medinaceli e colaboradores (1982) desenvolveram um método quantitativo para analisar o desempenho do membro posterior de ratos, examinando suas pegadas, conhecido como Índice Funcional do Ciático (IFC). Mais tarde, esse método foi modificado por diferentes autores, conforme as suas necessidades particulares (9, 10, 11, 12, 13). A análise do vestígio do caminhar tem sido intensamente empregada nos estudos de lesões do nervo ciático de ratos e é considerado um importante indicador da recuperação da sua função global. Apesar disso, esta análise fica comprometida por uma série de inconvenientes (14) e não leva em consideração a função dinâmica do membro estudado (15). Alguns autores, posteriormente, descreveram e propuseram técnicas alternativas que utilizam análises computadorizadas da deambulação (10, 16, 17). Conforme esses autores, tais técnicas são sensíveis, facilmente reproduzíveis e dignas de confiança. Apesar dessas vantagens, as análises computadorizadas sugeridas acima exigem equipamentos de alto custo, de difícil aquisição e requerem tempo prolongado de familiarização e treinamento para o manuseio dos sistemas.

De acordo com a proposta original de Medinaceli (1), os ratos devem ser colocados em um corredor com uma gaiola escura no fim. Uma lâmina de filme de raios-X não exposto é colocada no fundo (chão) e as patas traseiras dos ratos são mergulhadas em um prato plano contendo revelador. As pegadas

impressas aparecem imediatamente no filme e são perenes. Quatro variáveis são medidas, sendo estas: a distância da pata oposta, o comprimento da pegada, a distância entre o 1º e o 5º artelhos, e a distância entre os 2º e o 4º artelhos.

Desde que esse método foi desenvolvido, sua validade tem sido questionada por muitos pesquisadores. Um dos motivos desse questionamento reside no fato de que para a obtenção de informações claras das variáveis do IFC são necessárias inúmeras repetições dos procedimentos inerentes, principalmente por conta da recorrente produção de artefatos indesejáveis à boa avaliação das pegadas. Bain et al. (9) afirmam que os ratos desenvolvem um padrão característico de marcha, dependendo do local e da extensão da lesão nervosa. A lesão completa do nervo ciático resulta na baixa flexão plantar do tornozelo, menor espraimento dos artelhos, tendência ao arrastamento da pata devido à baixa função do nervo fibular e aumento do comprimento da pegada devido à alteração funcional dos plantiflexores. Essas alterações morfofuncionais, invariavelmente, produzem os artefatos que prejudicam a impressão das pegadas durante a deambulação, principalmente durante os estágios iniciais da lesão. Por esse motivo e decorrente dos avanços tecnológicos, técnicas de captura e análise digital da deambulação de animais de laboratório têm sido sugeridas.

Na vídeo-imagem, adicionalmente, pode-se avaliar o ASA (*ankle stance angle* - ângulo do tornozelo na fase de apoio intermediário) que, segundo Lin et al. (16), é sensível e válido em detectar a recuperação funcional pós-lesão do ciático. A fase de apoio intermediário é definida como o começo da fase de extensão, que é quando o animal começa a erguer seu calcanhar e se prepara para impulsionar a pata para o próximo passo.

Tomadas em conjunto, as observações relacionadas acima sugerem e demandam o desenvolvimento de métodos e técnicas alternativas que permitam avaliações igualmente precisas, porém menos onerosas, da recuperação funcional do nervo ciático, além de acessíveis para a grande maioria dos pesquisadores que contam com recursos financeiros limitados. Como as demais técnicas, com a presente proposta, é possível implementar e selecionar alguns parâmetros capazes de fornecer resultados válidos e precisos, além de instituir um método padrão de avaliação não só de lesões nervosas periféricas, mas também de doenças neurodegenerativas, reumáticas, ortopédicas, modelos de dor, entre outras.

Não menos importante, acredita-se que com o método descrito a seguir seja possível, também, avaliar os efeitos de diferentes recursos terapêuticos desenhados para o tratamento de várias condições mórbidas, não só das circunscritas ao sistema nervoso, mas de todas aquelas que comprometem o ato de caminhar.

Assim, o objetivo principal desse trabalho foi desenvolver tecnologia acessível e de baixo custo destinada à avaliação funcional da marcha de roedores.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra foi composta por 10 ratos machos, adultos jovens, da raça *Wistar*, com peso entre 250 e 300 g, procedentes do Biotério Central da Universidade Regional de Blumenau.

Durante a experimentação, os animais foram alojados em gaiolas individuais, mantidas no biotério setorial do Laboratório de Fisioterapia Neurológica Experimental, da Universidade Regional de Blumenau (FURB), com temperatura controlada (~22°C), ciclo claro/escuro de 12 horas (07h00~19h00 – ciclo claro sob luz artificial), renovação de ar controlada e programada, e livre acesso à água e à ração.

Durante os 10 primeiros dias de ambientação no laboratório, os animais foram submetidos a um treinamento diário (durante 10 minutos) para se familiarizarem aos procedimentos de coleta de dados na pista de deambulação (deambulação em sentido único, em direção à caixa escura ao final dela e manuseio para a impregnação das patas posteriores com tinta). Essa pista foi confeccionada em MDF (chapa de fibra de madeira de média densidade) e acrílico, com 42 cm de comprimento, 8,5 cm de largura e 9 cm de altura para as proteções laterais (18).

Os procedimentos cirúrgicos foram conduzidos em condições de assepsia bem controladas e respeitaram os preceitos éticos de experimentação animal postulados pelo Colégio Brasileiro de

Experimentação Animal (19). Todas as condutas aqui descritas foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FURB (protocolo CEEA-FURB n.º 014/03-A).

Inicialmente, foi aplicado 0,2 ml (dose fixa) de cloridrato de xilazina solução aquosa a 2% associado ao cloridrato de cetamina (50 mg/ml, vol. = 0,3 ml/kg). Após a verificação do estado de consciência do animal (por meio do pinçamento das pregas interdigitais) efetuou-se a tricotomia da pata posterior direita. Após, fez-se uma incisão curvilínea da pele, iniciando acima e medialmente ao grande trocater e terminando próxima à fossa poplíteia, ao nível da inserção dos músculos ísquio-tibiais. A exposição do nervo ciático foi conseguida após a separação do músculo semitendinoso do músculo reto-femoral. Com o auxílio de uma pinça hemostática, realizou-se o estrangulamento do referido nervo por 30 segundos. Em seguida, a divulsão muscular foi reparada com dois pontos de sutura com fio absorvível (catégute, 3-0) e foi realizada a assepsia local com álcool iodado (álcool a 70% + iodo a 10%). O fechamento da incisão foi feito com fio “mononylon” 2-0 acompanhado de aplicação tópica de antibiótico e antiinflamatório (Neotopic SMÓ *spray*).

Após o período programado de recuperação (24 horas) e aos 7, 14, 21 e 28 dias, foram feitas as coletas analógicas e digital da marcha.

Para a análise analógica, as patas traseiras dos ratos foram levemente pressionadas sobre uma almofada de carimbo embebida em tinta nanquim. Após, o animal foi colocado para caminhar na pista de deambulação sobre a qual foi depositada uma tira de papel quadriculado. As pegadas impressas sobre o papel foram posteriormente mensuradas com um paquímetro digital (marca Starret® série 721), e os respectivos valores foram introduzidos em uma planilha eletrônica para a obtenção automática do IFC. Sumariamente, os valores do IFC foram obtidos pela seguinte fórmula: $[IFC = -38.3 (EPL - NPL / NPL) + 109.5 (ETS - NTS / NTS) + 13.3 (EIT - NIT / NIT) - 8.8]$, onde: EPL = comprimento da pegada da pata experimental; NPL = comprimento da pegada da pata normal; ETS = distância entre o 1º e o 5º artelho da pata experimental; NPL = distância entre o 1º e o 5º artelho da pata normal; EIT = distância entre o 2º e o 4º artelho da pata experimental; NIT = distância entre o 2º e o 4º artelho da pata normal. Valores positivos (acima de zero) caracterizam função motora preservada/recuperada. Valores do IFC abaixo de zero mostram comprometimento funcional, e próximos de 100 configuram perda funcional total (8).

O ângulo do tornozelo (ASA) foi obtido pelo processamento digital do ângulo formado por duas linhas, uma referente à panturrilha e a outra conectando o maléolo lateral à cabeça do quarto metatarso. Um ângulo obtuso indica maior extensão do tornozelo, o que não ocorre no animal com o nervo ciático lesionado (ângulo agudo) (16).

A digitalização da deambulação dos animais foi obtida por meio de uma câmera de vídeo (Minolta, modelo C-512, velocidade do obturador ajustada em 1/8000, foco manual) posicionada a 1 metro de distância da pista de caminhada, acoplada a um microcomputador (IBM-PC compatível, genérico). As capturas continham imagens da deambulação dos ratos em perfil e por meio de um espelho colocado embaixo da pista, num ângulo de 45º de inclinação, das pegadas dos ratos em vista inferior. As tomadas deviam captar, pelo menos, quatro passos consecutivos. Desses, foram escolhidos dois passos consecutivos, caracterizando um ciclo completo da passada (20).

Transcorridos os dias necessários para a conclusão de todos os procedimentos, os animais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica (21).

Por meio do programa “Windows Movie Maker” (integrante do sistema operacional Windows-XP, professional edition, Microsoft Corp., 2002), as filmagens foram armazenadas (formato mpeg, 640 x 480 pixels/polegada, taxa de transferência de dados de 6.000 kilobits por segundo) em disco rígido e examinadas “off-line”. Nessa etapa, os vídeos brutos foram editados e armazenados no mesmo formato a uma taxa de 29,97 quadros por segundo. Após, foram isolados diversos quadros contendo os momentos de interesse para as análises de deambulação dos ratos, bem como a avaliação das características qualitativas da sua marcha.

Os quadros de interesse foram exportados para o programa “Image-J” (versão 1.30, National Institute of Health, 2003 - freeware) para serem calculados os parâmetros do IFC e do ASA (obtido exclusivamente pela técnica digital), todos durante a fase de apoio intermediário da marcha (20).

Os valores finais do IFC (analogico e digital) e do ASA foram exportados para uma planilha eletrônica com o intuito de se calcular as respectivas médias e desvios-padrão (Statistica, ver. 5.2, Statsoft, Inc.).

RESULTADOS

Apesar de ter havido um período de treinamento, alguns ratos ainda se mostraram agitados durante a coleta das variáveis da deambulação. Sem treinamento, os animais tendiam a retornar e fazer o percurso no sentido inverso, sair por cima das paredes laterais ou, ainda, paravam no meio do percurso para explorar o ambiente. Por esse motivo, sugerimos que o período de treinamento não seja inferior a 10 dias.

A análise funcional analógica teve que ser realizada inúmeras vezes com cada animal, pois ao posicionar as patas do animal sobre a almofada para embebê-la em tinta, este embebia, também, a cauda, deixando rastros por sobre as pegadas, inutilizando o registro e forçando uma nova coleta. Vale salientar que, os procedimentos de coleta digital de tais parâmetros são imunes a esse tipo de artefato indesejado.

Outro fator que dificultou o registro analógico das pegadas foram os erros na impressão das patas, como borrões, excesso ou falta de tinta decorrente da parada ou excesso de velocidade dos animais na pista. Quando o rato parava, pressionava a região plantar inteira e abaixava o calcanhar, criando uma falsa e atípica extensão impressa. Antes de entrar na caixa escura, ele se levantava e colocava todo o peso do seu corpo sobre as patas traseiras, produzindo, então, uma pegada falsa.

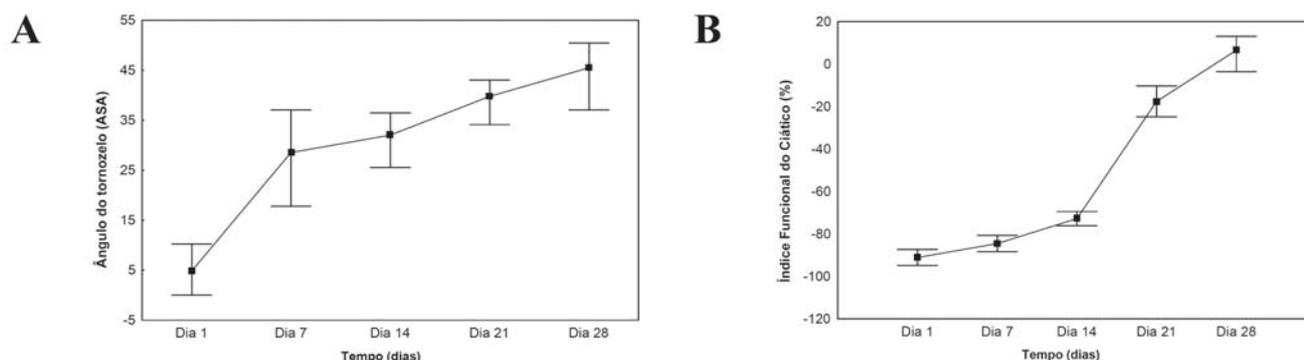


FIGURA 1 - Gráficos resultantes das medidas (médias \pm desvio padrão) do ângulo do tornozelo (A) e do índice funcional do ciático (B) durante a fase E₂ da marcha, ao longo de 28 dias de experimentação

A primeira análise do IFC, realizada 24 horas após a lesão, mostrou perda da função motora de 100% em todos os animais estudados, o que fez com que houvesse grande alteração no padrão de marcha dos ratos. Quanto ao ASA, observou-se redução marcante dessa variável durante a fase de apoio intermediário (Figura 1). Alguns animais deambularam arrastando o dorso da pata lesionada e compensando a transferência de peso com o lado não-comprometido. Esse fato impediu a obtenção do IFC e do ASA, posto que as variáveis necessárias para esse fim não puderam ser coletadas. Além disso, tal compensação não pôde ser observada na coleta analógica, pois a impressão em tinta não revela tal comprometimento.

Com a rotação externa dos artelhos aumentada após a lesão, houve redução do braço de alavanca para o tríceps sural para gerar o movimento de plantiflexão. Além do mais, a habilidade dos plantiflexores em proporcionar suporte propulsor para frente durante a fase de impulso foi seriamente afetada. Essa modificação biomecânica não pode ser captada pela técnica analógica, que se restringe exclusivamente em determinar o espraiamento dos artelhos e o tamanho da pegada.

As pegadas foram longas e estreitas no lado lesado em comparação com o lado normal, isso porque os animais usaram ambos os calcanhares e encolheram os artelhos para a fase de apoio intermediário. Os ratos foram capazes de andar sobre os artelhos, mas incapazes de transferir o peso sobre ele. Além disso, as pegadas também mostraram adução dos artelhos, e a queda da pata direita pôde ser vista durante a fase oscilatória da deambulação.

Outro fator que alterou a coleta das pegadas foi a contratura de flexores em alguns ratos (dados não apresentados no presente trabalho), fato que não ficou evidenciado na análise analógica, mas sim na análise digital. Este evento provoca grande alteração no parâmetro “comprimento da pegada” dada à variação na velocidade da deambulação e na transferência de peso.

A recuperação das variáveis individuais do IFC e do ASA ocorreram simultaneamente no decorrer dos 28 dias de experimento, mostrando a cada análise melhora no padrão da marcha (Figuras 1 e 2). A rotação externa da pata e o comprimento da pegada foram diminuindo; a distância entre o 1º e o 5º artelhos e a do 2º ao 4º artelhos foram aumentando, e o ângulo do tornozelo também aumentou, revelando maior duração da fase de apoio intermediário do lado comprometido, o que caracteriza transferência de peso mais adequada e proporcional entre as duas patas. É interessante notar, entretanto, que a evolução dessas duas variáveis acontece de maneira diferenciada, isto é, os tempos e os ganhos de função não se correlacionam linearmente, como pode ser visto na Figura 1.

A Figura 2 também mostra a mudança angular da articulação do tornozelo durante a fase de apoio intermediário. Os ratos demonstraram visível aumento dos ângulos do tornozelo, o que revela uma boa recuperação funcional do nervo ciático. Ainda, foi possível observar que no período inicial de recuperação houve redução da fase de apoio intermediário, possivelmente devido à atrofia muscular do tríceps sural.

DISCUSSÃO

Sendo o IFC derivado de pegadas impressas de ratos, seu valor é determinado principalmente em função dos músculos intrínsecos da pata (5, 7, 14). Devido à baixa regeneração do nervo, o tempo requerido para regeneração dos músculos da pata é longo, quando comparado com o tempo requerido para a recuperação dos músculos proximais (16). Com isso, o IFC analógico mostra-se menos acurado que o ASA, pois é impossível visualizar estes detalhes e avaliar a transferência de peso e a angulação das articulações das patas. Lin e colaboradores (16) afirmam que a atrofia pós-lesão nervosa periférica torna o animal inapto para levar o peso do próprio corpo contra a gravidade para o suporte em um único membro. Com a perda da plantiflexão, o ângulo do tornozelo é reduzido.

A figura 2 mostra a evolução da abertura dos artelhos durante o processo de recuperação. Logo após a lesão, para conseguir realizar a fase de apoio intermediário, o animal faz adução dos artelhos. Na vídeo-imagem, é possível calcular com precisão a distância entre o 1º e o 5º artelhos (Figura 2A) e entre o 2º e o 4º artelhos (Figura 2B), devido à visualização dos pontos de pressão pelo piso transparente. Na análise analógica, às vezes, esse cálculo não é fidedigno ou não é mensurável, pois a tinta usada nas patas pode não delimitar com precisão as distâncias mensuradas ou, devido às contraturas, o animal pode fazer a elevação de algum artelho não o registrando no papel. Ainda, o animal pode realizar o apoio na face lateral da pata, sem tocar os artelhos na superfície de apoio.

Na análise analógica perdem-se momentos importantes da marcha, como, por exemplo, a fase de apoio intermediário, ficando somente a impressão de uma parcela reduzida de toda a pegada. Ademais, é impossível definir exatamente o momento em que a pegada foi coletada (Figura 2A, B e C), interferindo diretamente no resultado da medida dos parâmetros, fato que pôde ser bem observado e contornado na análise digital.

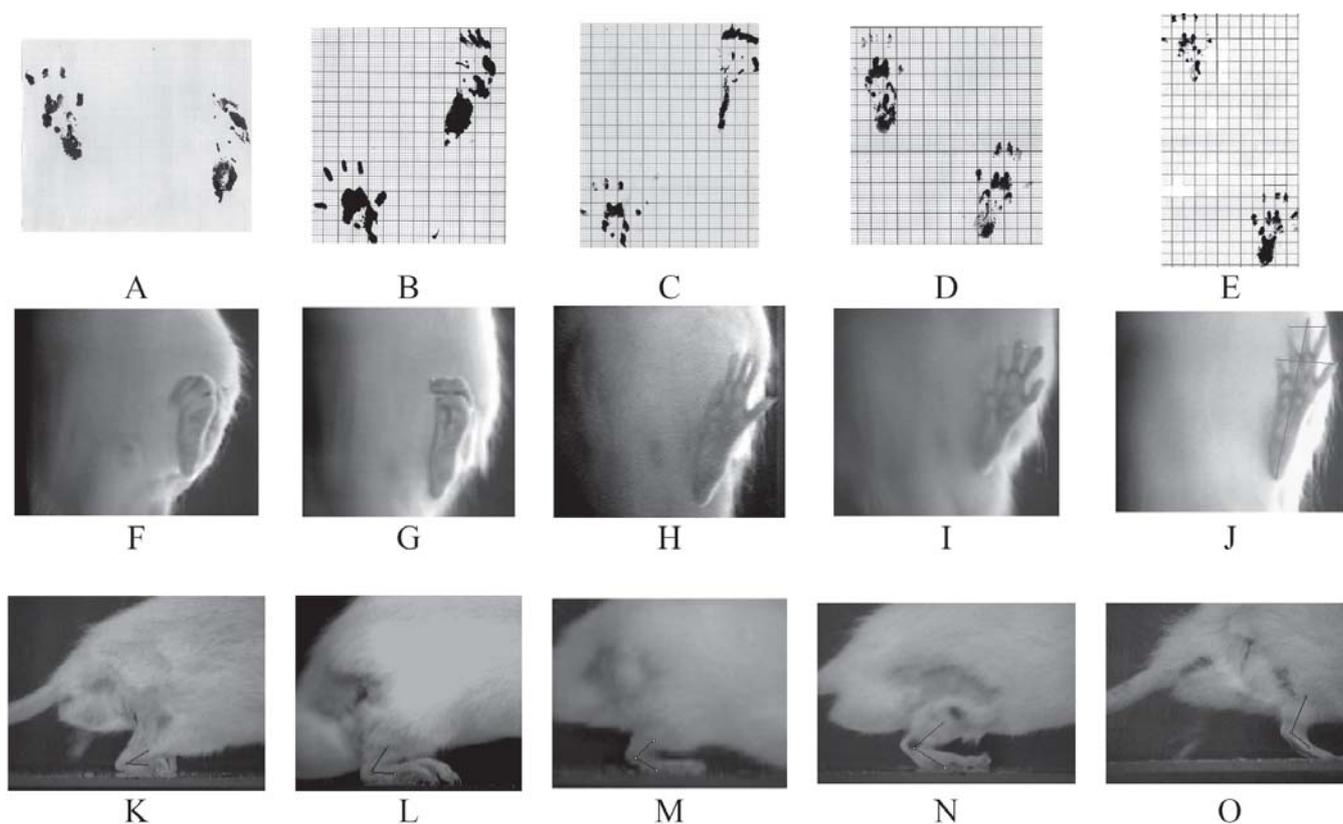


FIGURA 2 - Fotografias típicas das análises (analógica e digitais) realizadas ao longo de 28 dias de experimentação. Na seqüência A~E, temos as pegadas impressas em papel, referentes aos dias 1, 7, 14, 21 e 28, de onde foram extraídos os dados para o cálculo do IFC. Note a evolução do espriamento dos dedos ao longo dos 28 dias, apesar da impossibilidade da coleta precisa da posição demarcada pelos artelhos (A, B e C). Na seqüência F~J, estão quadros que denunciam claramente a atitude flexora dos artelhos (F e G) e o progresso no sentido da recuperação funcional total (J). Abaixo (seqüência K~O) observa-se a evolução progressiva do ASA que, apesar da contratura dos artelhos visualizada no segmento K, não sofre interferência na sua coleta

Na análise digital, durante a fase de apoio intermediário, além do comprimento da pegada, do ângulo do tornozelo e das distâncias entre os artelhos, outros parâmetros podem ser avaliados, como a distância entre as patas e a largura da passada. Essas variáveis também podem sofrer alterações na presença de lesão do nervo ciático, e podem compor dados importantes para se estudar a evolução da função nervosa periférica (17). Excluimos tal possibilidade, uma vez que a proposta atual trata de um método simplificado de análise da marcha.

CONCLUSÃO

A análise funcional da marcha é um importante instrumento de avaliação de aspectos específicos da recuperação do nervo ciático de uma maneira não-invasiva. Apesar da análise analógica da marcha ser de fácil aplicação e implicar em custos reduzidíssimos, mensurações precisas da função motora são freqüentemente impossíveis de se realizar, requerendo maior tempo para a coleta dos dados e maior número de repetições. Por intermédio da análise digital que sugerimos no presente trabalho, é possível realizar avaliações dinâmicas de todo o processo de deambulação de roedores, fato que é impossível quando são usados recursos analógicos de avaliação da marcha. Apesar da escolha de um modelo de axoniotmese, acredita-se que a técnica pode ser empregada, também, em outros modelos animais utilizados para o estudo das repercussões de diferentes fatores que comprometem não só a marcha, mas a função motora como um todo.

REFERÊNCIAS

1. Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neuroscience Research*. 1996;25:101-121.
2. Vogelaar CF, Vrinten DH, Hoekman MFM, Brakkee JH, Burbach JPH, Hamers FPT. Sciatic nerve regeneration in mice and rats: recovery of sensory innervation is followed by a slowly retreating neuropathic pain-like syndrome. *Brain Research*. 2004;1027:67-72.
3. Metz GA, Whishaw IQ. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *Journal of Neuroscience Methods*. 2002;115:169-179.
4. Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle & Nerve*. 2000;23:863-873.
5. Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsberger A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *Journal of Neuroscience Methods*. 2000;96:89-96.
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. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. 2001;17(1):69-75.
7. Yu P, Matloub HS, Sanger JR. Gait analysis in rats with peripheral nerve injury. *Muscle & Nerve*. 2001;24:231-239.
8. Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Experimental Neurology*. 1982;77:634-643.
9. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1989;83(1):129-136.
10. Bervar M. Video analysis of standing – an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *Journal of Neuroscience Methods*. 2001;102:109-116.
11. Kunkel-Bagden E, Dai H, Bregman BS. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Experimental Neurology*. 1993;119:153-164.
12. Santos PM, Williams SL, Thomas SS. Neuromuscular evaluation using rat gait analysis. *Journal of Neuroscience Methods*. 1995;61:79-84.
13. Varejão ASP, Cabrita AM, Patrício JAB, Bulas-Cruz J, Gabriel RC, Meek MF. Functional assessment of peripheral nerve recovery in the Rat: Gait Kinematics. *Microsurgery*. 2001;21:383-388.

14. Varejão ASP, Meek MF, Ferreira AJA, Patrício JAB, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *Journal of Neuroscience Methods*. 2001;108:1-9.
15. Dellon AL, Mackinnon SE. Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. *Microsurgery*. 1989;10:220-225.
16. Lin FM, Pan YC, Hom C, Sabbahi M, Shenag S. Ankle stance angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery after complete transection. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. 1996;12:173-177.
17. Varejão ASP, Cabrita AM, Geuna S, Melo-Pinto P, Filipe VM, Gramsberger A, Meek MF. Toe out angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. *Experimental Neurology*. 2003;183:695-699.
18. Buerger C, Imme JL, Silva ES, André ES. Efeitos da laserterapia de baixa potência sobre os processos de regeneração do tecido nervoso periférico. *Revista Fisioterapia em Movimento*. 2004;17(2):67-74.
19. Colégio brasileiro de experimentação animal – COBEA. Os princípios éticos da experimentação animal. São Paulo: Cobeia; 1991.
20. Engberg I, Lundberg A. An electromyographic analysis of muscular activity in the hindlimb of the cat during unrestrained locomotion. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1969;75:614-630.
21. Krinke GJ. editor. *The Laboratory rat: the handbook of experimental animal*. London: Academic Press; 2000.

Recebido: 12/12/2007

Received: 12/12/2007

Aprovado: 28/02/2008

Approved: 02/28/2008