

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS E NÍVEIS SÉRICOS DE
CORTICOSTERONA EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO
ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL**

Fabiana Uez

PORTO ALEGRE

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS E NÍVEIS SÉRICOS DE
CORTICOSTERONA EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO
ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL**

Autora: Fabiana Uez

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias

Orientador: Prof. Dr. André Silva Carissimi

Co-Orientador: Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini

PORTO ALEGRE

2005

AGRADECIMENTOS

Ao professor André Silva Carissimi, meu orientador, pela amizade, confiança e principalmente pela oportunidade.

Ao professor Emerson Antonio Contesini, meu co-orientador, pelo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis.

Ao meu amor Ivanês, pelo companheirismo, auxílio e incentivo.

Aos meus pais Lino e Verônica, pelo carinho e dedicação.

À Luciane Vieira, pela amizade de longa data e ajuda inestimável nestes últimos dois anos.

Às colegas Carla e Mariana, pela colaboração na execução do experimento.

Ao Francisco e à Rosecler, pela disposição para processar as amostras.

Aos demais amigos e colegas que se envolveram direta ou indiretamente neste trabalho.

Aos funcionários do CREAL e do laboratório de virologia da UFRGS pela atenção e ajuda.

À UFRGS por mais uma vez permitir meus estudos de forma gratuita.

Nunca deixe que lhe digam
Que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém...

Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança.

Flávio Venturini/Renato Russo

RESUMO

Os resultados demonstram que não houve diferença estatística significativa em relação às áreas da ferida entre os grupos analisados (G2, G3 e G4) dentro do mesmo dia de observação. Entretanto, na avaliação histopatológica da cicatrização, houve diferença significativa na segunda semana de experimento entre as médias avaliadas do grupo G2 e o grupo G3 sendo que, este último apresentou melhor cicatrização quando comparado ao primeiro. Quanto ao nível de corticosterona observou-se diferença significativa do grupo G2 com relação aos demais grupos apenas na primeira semana. Este resultado indica que, na primeira semana, os animais submetidos à cirurgia e mantidos em ambientes sem EA tiveram níveis elevados de corticosterona, compatível com situação de estresse, enquanto que os animais que também sofreram procedimento cirúrgico, mas foram mantidos em ambientes enriquecidos no pós-operatório, apresentaram níveis de corticosterona similares àqueles que não sofreram intervenção cirúrgica. Desta forma, concluiu-se que a utilização do EA não altera a preocupação com o bem-estar dos animais utilizados na experimentação científica tem aumentado nos últimos anos bem como, a maneira com que o estresse pode interferir nos resultados das pesquisas. Entre as técnicas utilizadas para minimizar o estresse e promover o bem-estar destaca-se o enriquecimento ambiental (EA), que visa propiciar um ambiente no qual o animal possa demonstrar comportamentos típicos da espécie. Nas espécies até hoje estudadas o uso do EA tem sido favorável com resultados positivos tanto no aspecto comportamental como fisiológico. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do EA na recuperação pós-cirúrgica em *Rattus norvegicus* através da observação do nível de corticosterona sanguínea e o tempo de cicatrização, pela regressão do tamanho da ferida cirúrgica e posterior análise histopatológica. Ratos machos da linhagem Wistar foram separados em quatro grupos: sem procedimento cirúrgico e sem enriquecimento ambiental (grupo G1), com procedimento cirúrgico e sem enriquecimento ambiental (grupo G2), com procedimento cirúrgico e enriquecimento ambiental com mobiliário (grupo G3) e com procedimento cirúrgico e enriquecimento ambiental com interação social (grupo G4). No grupo G3, diferentes objetos (iglu, bloco de madeira e cilindro) foram colocados de forma sequencial nas gaiolas enquanto que na gaiola do grupo G4 foi introduzido outro rato, macho, com a mesma idade e peso dos utilizados no experimento como forma de interação social. significativamente o tempo de cicatrização de feridas cutâneas mas reduz o estresse pós-cirúrgico.

ABSTRACT

*The well-being of animals used on scientific research and the stress they go through have been worrying researches in the last years. Many procedures have been used to minimize the stress and promote the well-being of animals, mainly environmental enrichment (E.E.). This procedure aims to develop an environment where the animals could show the typical behaviors of the species. The E.E. has been studied in several species and has shown positive results on the behavioral and physiologic aspects. The aim of this study was to evaluate the effect of E.E. in post-surgical recovery in *Rattus norvegicus*, observing the serum corticosterone levels and the healing time by the decrease in surgical wound size and histopathological analyses. Male Wistar rats were separated in four groups: without surgical procedure and without E.E. (G1), with surgical procedure and without E.E. (G2), with surgical procedure and E.E. with furniture (G3) and with surgical procedure and E.E. with social interaction (G4). In the group G3, different kinds of objects (igloo, aspen blocks and a tube) were placed in a sequential form in the cages. In the cage of G4, another male rat of the same age and weight was introduced and used for social interaction experience. The results showed that there was no significant statistical difference comparing the surgical wound area among the analysed groups (G2, G3 and G4) in the same day of observation. However, the histopathological analyses of the healing revealed a significant difference in the second week between the G2 and G3 groups mean, the latter showing improved healing. In relation to the serum corticosterone concentrations, there was a significant difference between group G2 and the other groups only in the first week. This result reveals that in the first week, the animals submitted to the surgical procedure and maintained in an environment without E.E. had elevated corticosterone serum levels, compatible with a stressful situation, whereas the animals submitted to the same surgical procedure and maintained under E.E. post-surgically showed similar corticosterone levels than those that had not suffered surgical intervention. This way the used of E.E. don't change the healing time but reduced the stress post-surgical.*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1	Enriquecimento Ambiental.....	13
2.2	Corticosterona.....	21
2.3	Cicatrização.....	24
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Geral.....	29
3.2	Específicos.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1	Animais.....	30
4.2	Local.....	30
4.3	Grupos.....	30
4.4	Procedimento Cirúrgico.....	31
4.5	Técnicas de Enriquecimento.....	32
4.6	Coleta de Sangue.....	32
4.7	Dosagem de Corticosterona.....	33
4.8	Coleta do Fragmento de Pele.....	33
4.9	Avaliação Histopatológica.....	33
4.10	Procedimento Experimental.....	34
4.11	Número de Amostras Analisadas.....	35
4.12	Cronograma de Execução.....	36
4.13	Análise Estatística.....	38
5	RESULTADOS.....	39
5.1	Avaliação Macroscópica do Processo de Cicatrização.....	39
5.2	Análise Histopatológica.....	41
5.3	Níveis de Corticosterona.....	43
6	DISCUSSÃO.....	45
7	CONCLUSÕES.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Diagrama mostrando região tóraco-lombar dorsal onde foi removido retalho de pele e tecido subcutâneo do animal.....	31
FIGURA 2-	Tipos de enriquecimentos ambientais utilizados (A: iglu, B: cubos, C: cilindros).....	32
FIGURA 3-	Interação com o enriquecimento ambiental com mobiliário: iglu (A), cubo (B), cilindro (C).....	35
FIGURA 4-	Cronograma de execução.....	37
FIGURA 5-	Percentual de área da ferida cirúrgica remanescente em relação à área inicial por dia de experimento em cada grupo. Os dados estão expressos em média \pm desvio-padrão da área em porcentagem.....	40
FIGURA 6-	Escores médios da avaliação histopatológica de fragmentos de pele em cada semana após cirurgia por grupo. Os resultados estão expressos em média \pm desvio-padrão.....	42
FIGURA 7-	Níveis de corticosterona por semana em cada grupo. Os resultados estão expressos em média \pm desvio-padrão.....	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Número de amostras analisadas por grupo a cada semana de observação macroscópica do processo de cicatrização. Porto Alegre, 2005	36
TABELA 2- Percentual de área de ferida cirúrgica em relação à área inicial por dia de experimento em cada grupo. Média \pm desvio-padrão. Porto Alegre, 2005.....	39
TABELA 3- Escores médios da avaliação histopatológica de fragmentos de pele e tecido subcutâneo em cada semana após cirurgia por grupo. Média \pm desvio-padrão. Porto Alegre, 2005.....	41
TABELA 4- Níveis de corticosterona por semana em cada grupo. Média \pm desvio-padrão. Porto Alegre, 2005.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
⁰ C	Graus Celsius
cm	Centímetro
CREAL	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
EA	Enriquecimento Ambiental
HE	Hematoxilina e Eosina
HPA	Hipotálamo Pituitária Adrenal
ICBS	Instituto de Ciências Básicas e da Saúde
Kg	Quilograma
m ²	Metro quadrado
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
ng	Nanograma
p	Probabilidade
PMN	Polimorfonucleadas
PVC	Policloreto de Vinila
RIA	Radioimunoensaio
rpm	Rotações por minuto
%	Porcentagem

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a preocupação com o bem-estar animal tem sido evidente, principalmente em relação ao uso de animais na experimentação científica (CLARK; RAGER; CALPIN, 1997). A necessidade de manejo adequado antes, durante e após a execução de procedimentos em animais de laboratório é essencial para proporcionar o bem-estar. Considerando a grande utilização de ratos como modelos experimentais nas mais diversas áreas, é fundamental para a qualidade das pesquisas, ensino e testes nos quais estes animais são utilizados, conhecer e minimizar as variáveis que poderão interferir nos resultados.

O estresse é um dos fatores com potencial para afetar estas variáveis uma vez que apresenta implicações clínicas importantes como, por exemplo, na regulação da cicatrização.

Dessa forma, o presente trabalho visa avaliar o uso de enriquecimento ambiental como promotor de um ambiente menos estressante, possibilitando uma recuperação cirúrgica mais adequada e de acordo com os princípios de bem-estar animal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A criação de animais de laboratório de padrão sanitário definido e sua manutenção em ambientes controlados tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas para suprir a demanda da comunidade científica, uma vez que a qualidade da pesquisa e o valor das conclusões obtidas são diretamente proporcionais à sua qualidade (HEINE, 1978).

Dessa forma, para assegurar a reprodutibilidade e fidedignidade dos resultados, foram estabelecidas normas e recomendações para a criação e manutenção de animais destinados à pesquisa, especialmente em genética, manejo, nutrição e instalações (ILAR, 1996; CCAC, 1998).

Entre os fatores padronizados, o meio ambiente é o que possui maior complexidade face ao número de elementos envolvidos e suas inter-relações. A maioria dos animais utilizados nas pesquisas são mamíferos e, portanto, endotérmicos, possuindo mecanismos sensíveis com a finalidade de manter a temperatura corporal dentro de certos limites. De modo geral, os mamíferos respondem às variações ambientais alterando seu comportamento ou sua fisiologia em prol da manutenção da homeostasia. Estas respostas compensatórias são geralmente mediadas pelo sistema neuroendócrino, que é capaz de influenciar determinados resultados (CLOUGH, 1987).

Sabe-se que variações nas condições climáticas do local onde os animais estão alojados podem causar alterações nas respostas experimentais, o que é preocupante em pesquisas nas áreas de farmacologia e imunologia (WEIHE, 1976).

Estudos com camundongos e ratos demonstraram que o controle de temperatura, umidade, concentração de gases e particulados no microambiente contribuem para a sanidade e conforto dos mesmos (BESCH, 1985; BESCH, 1992). Entende-se como microambiente o espaço físico imediatamente ao redor do animal de laboratório, ou seja, aquele delimitado pela gaiola, possuindo características ambientais distintas à sala de biotério onde a gaiola está localizada (macroambiente). Essa peculiaridade do microambiente pode induzir mudanças nos processos metabólicos e fisiológicos ou mesmo aumentar a susceptibilidade às doenças respiratórias (BRODERSON; LINDSEY; CRAWFORD, 1976; BESCH, 1992).

A qualidade do ambiente está diretamente relacionada com a densidade populacional da gaiola, pois a concentração de gases como amônia e dióxido de carbono

aumenta quanto maior for o número de indivíduos alojados (BESCH, 1985). A lotação da gaiola também visa promover o bem-estar animal ao garantir uma área mínima para que este possa se locomover e se exercitar (CCAC, 1998).

Dessa forma, os biotérios foram construídos de maneira a fornecer um ambiente extremamente controlado quanto à questão ambiental, capaz de produzir e manter espécies animais em alto grau de higidez com economia e eficiência (ANNA; OLSSON; DAHLBORN, 2002). Toda essa normatização, embora tenha contribuído para o avanço da qualidade sanitária, comprometeu o bem-estar animal pela manutenção dos mesmos em um ambiente artificial que não lhes permitem demonstrarem comportamentos típicos da espécie (HUGHES; DUNCAN, 1988).

2.1 Enriquecimento Ambiental

Um programa de manejo deve prover um ambiente e cuidados de modo a possibilitar aos animais bom crescimento, desenvolvimento e reprodução, assim como boa saúde e bem-estar, minimizando o impacto das variáveis que podem afetar os resultados de pesquisas (ILAR, 1996).

A manutenção de animais de experimentação requer um sistema de alojamento adequado para suprir as necessidades biológicas e comportamentais, sendo de responsabilidade do pesquisador planejar e escolher a metodologia que minimize os efeitos adversos em cada espécie (SCHARMANN, 1991).

Neste aspecto, a melhoria das condições de alojamento também inclui o fornecimento de um ambiente físico que contemple necessidades etológicas dos animais. Assim, principalmente na última década, a pesquisa sobre a aplicação de técnicas de enriquecimento ambiental em espécies animais mantidas em recintos fechados tem se desenvolvido rapidamente. Hoje, elas podem ser aplicadas nas espécies mantidas em ambiente diferente daquele de ocorrência natural. Sem dúvida nenhuma, os primatas são os animais que mais respondem favoravelmente ao enriquecimento, sendo que a maior parte dos trabalhos e os melhores resultados foram obtidos com melhoramento de seus recintos. Respostas como a redução de comportamentos anormais, redução de “scratching”, menor agressividade, melhor desempenho reprodutivo, maior prolificidade em cativeiro e redução nos níveis de cortisol são alguns

resultados obtidos com o enriquecimento ambiental em macacos (BRENT; LEE; EICHBERG, 1989; LINE et al., 1991; VISALBERGHI; FRAGASZY, 1995; STRIER; ZIEGLER, 1997; GINTHER; ZIEGLER; SNOWDON, 2001).

Na última década, as técnicas de enriquecimento ambiental tiveram uma ampla utilização em zoológicos e, similarmente, puderam ser implantadas em laboratórios de experimentação, com o objetivo de melhorar, de modo simples, o bem-estar animal. Entretanto, elas também beneficiaram a ciência uma vez que o estresse, considerado uma variável importante nos resultados das pesquisas, foi reduzido através de ambientes enriquecidos (KEY, 2004).

A literatura nessa área é ainda escassa para roedores, pois até pouco tempo atrás não existia preocupação com o bem-estar de animais de laboratório, até porque os pesquisadores estavam mais interessados no resultado propriamente dito que na influência do comportamento animal sobre as suas observações experimentais. Tradicionalmente, os cientistas têm um menor envolvimento pessoal e sentimental com os ratos do que com outras espécies utilizadas como modelos experimentais (SERPELL, 1999). Em contraste, o público em geral e muitos pesquisadores estão conscientes da importância em fornecer uma boa qualidade de vida para todas espécies. Os ratos podem viver e procriar em condições bastante desfavoráveis, porém, mantidos em ambientes mais adequados, comportar-se-iam mais naturalmente e demonstrariam maiores vantagens tanto físicas quanto comportamentais (RENNER; ROSENZWEIG, 1986 apud PATTERSON-KANE, 2001).

Existem evidências que animais de laboratório cujo bem-estar está comprometido são fisiológica e imunologicamente anormais, e que quando utilizados em experimentos podem levar à obtenção de conclusões não confiáveis (POOLE, 1997).

Segundo Boere (2001), o enriquecimento ambiental é um conjunto de técnicas que modificam o ambiente, melhorando a qualidade de vida dos animais ao satisfazer suas necessidades comportamentais. O enriquecimento pode diminuir o estresse e melhorar o bem-estar, bem como aumentar a qualidade de uma criação ao adequar o manejo a padrões éticos aceitáveis, estimular o repertório normal do comportamento, diminuir a casuística clínica, diminuir a mortalidade, incrementar a taxa reprodutiva e maximizar a relação custo/benefício.

O objetivo do enriquecimento ambiental é garantir o bem-estar para melhorar a qualidade de vida em cativeiro, que pode ser afetada pelo confinamento. Desta maneira,

deverá ser complexo e mutável o suficiente para o animal experimentar uma variedade de estados emocionais (POOLE, 1996).

Animais de laboratório têm a necessidade de viver em um ambiente que favoreça a expressão de comportamentos típicos de cada espécie e, por isso, o enriquecimento ambiental tem sido considerado o melhor caminho (STEWART; BAYNE, 2004).

Segundo Baumans e Van de Weerd (1996) fatores ambientais exercem importante influência nos animais de laboratório e nos resultados dos experimentos uma vez que a gaiola representa o seu meio ambiente. O enriquecimento ambiental pode ser uma maneira possível de melhorar as condições da gaiola, focalizando alguns aspectos sociais, nutricionais, sensoriais, psicológicos e físicos. Quando se opta pela sua introdução é essencial avaliar o tipo a ser utilizado e observar se o animal responde ou não. Os métodos podem ser analisados com testes de preferência, observação e testes comportamentais e parâmetros fisiológicos, como por exemplo, a dosagem de corticosterona. Quando um programa de enriquecimento é adotado sua praticidade de uso e os custos são itens importantes a serem levados em consideração. Objetos que poderão ser introduzidos nas gaiolas como forma de enriquecimento devem ser estimulantes mas também fáceis de remover, limpar ou substituir, fazendo com que os profissionais que trabalham no laboratório não se oponham ao seu uso. Desta forma, o enriquecimento ambiental será benéfico para o animal, e estes profissionais terão maior motivação para aperfeiçoá-lo.

Stewart (2003) ressaltou algumas dificuldades durante o desenvolvimento de um programa de enriquecimento ambiental para animais de laboratório. O custo com a implantação, necessidade de treinamento pessoal, dificuldade de higienização e manipulação, bem como a segurança, são alguns dos obstáculos comumente encontrados.

Para Krohn (1998) a principal questão entretanto, é se o enriquecimento reduz ou aumenta o estresse nos animais.

Tsai et al. (2002) pesquisaram a influência de ambientes enriquecidos e não enriquecidos em três linhagens distintas de camundongos na tentativa de coletar mais informações sobre os efeitos desta técnica. Os resultados sugeriram que as variáveis avaliadas (peso corporal, peso dos órgãos internos e hematologia) não foram significativamente influenciadas pelo enriquecimento, mas que este pode não ter tido um efeito igual ou similar para todas as linhagens ou experimentos. Os autores concluíram que alterações no coeficiente de variação podem ocorrer dependendo do tipo

de enriquecimento, da linhagem, das variáveis estudadas e da duração do experimento. Por isso, cada efeito deve ser levado em consideração quando uma pesquisa é planejada.

Resultados semelhantes foram encontrados por Tsai et al. (2003) quando machos e fêmeas de camundongos DBA/2 foram separados em três grupos: um deles sem enriquecimento (controle) e os outros dois com enriquecimento (material de ninho e divisórias verticais e horizontais). Testes comportamentais e medidas fisiológicas como análise hematológica, níveis de corticosterona e tiroxina, peso corporal e peso dos órgãos foram avaliados. Neste caso, os efeitos do esquema de enriquecimento utilizado não foram consistentes e modificaram de acordo com a variável e o sexo.

Entretanto, Patterson-Kane (2001) em sua revisão bibliográfica sobre enriquecimento ambiental em ratos relatou a importância, os tipos e as vantagens desta técnica. O bem-estar pode ser promovido através do contato entre animais, inclusão na gaiola de objetos para roer ou ainda a utilização de cama e abrigos apropriados. Alguns tipos de enriquecimento como brinquedos ou simplesmente aumento do espaço físico demonstraram-se ineficazes em produzir qualquer benefício. Sendo assim, a finalidade é reproduzir da melhor forma possível as características de um ambiente natural no ambiente da gaiola.

O número de animais de laboratório por gaiola tem sido considerado um importante fator que pode influenciar respostas fisiológicas, comportamentais e imunológicas. Peng et al. (1989) investigaram os efeitos de grupos com dois, quatro e oito camundongos no nível de corticosterona e linfócitos. Os resultados sugerem que uma população de quatro animais por gaiola induz a um estresse mínimo quando comparada com os outros dois grupos analisados. Segundo os autores, como o estresse é conhecido por causar alterações em uma variedade de funções biológicas, a densidade populacional deve ser considerada na interpretação dos dados de uma pesquisa.

O efeito negativo do alojamento individual nos ratos também foi confirmado através da detecção de níveis anormais de glicose e triglicerídeos em animais nestas condições (PÉREZ et al., 1997).

Einon et al. (1981) pesquisaram os efeitos do isolamento no comportamento de ratos, camundongos, gerbilos e cobaias. Segundo os autores, quando isolados, ratos demonstraram alterações comportamentais como aumento na timidez e agressividade, sendo estes efeitos reversíveis após a recolocação dos animais em gaiolas com interação social. Entretanto, em ratos isolados antes dos 50 dias de idade foram observadas

mudanças permanentes no comportamento, o que não ocorreu nas outras espécies estudadas.

Camundongos machos são menos utilizados do que fêmeas em pesquisas biomédicas e normalmente mantidos em gaiolas individuais devido ao seu conhecido comportamento agressivo. Porém, como se trata de uma espécie de natureza sociável, Van Loo et al. (2004) decidiram comparar a preferência destes animais entre gaiola com interação social (outro camundongo macho), enriquecidas (material de ninho) e padronizadas. Os resultados mostraram a preferência por gaiolas onde o contato com outro animal pode ser mantido. Gaiolas com enriquecimento foram mais utilizadas para dormir, “grooming” e manipulação do ninho. Com isso os autores concluíram que quando for inviável manter os animais em grupo, devido ao desenvolvimento de agressividade, a colocação de ninho pode compensar a privação do contato social.

Se o enriquecimento social é importante, a introdução de objetos na gaiola também possui benefícios para os ratos. A presença de abrigos, esconderijos e tubos, incentivaram os animais à locomoção e a uma diversidade de comportamentos, enquanto que animais em gaiolas sem enriquecimento demonstraram tendência a dormir mais (BATCHELOR,1994).

Segundo Juraska e Meyer (1986), ratos de ambos os sexos colocados em ambiente enriquecido após o desmame gastaram mais tempo interagindo com objetos do que com outros animais do grupo (interação social).

Entretanto, Renner e Rosenzweig (1986) não encontraram diferenças comportamentais significativas quando compararam ratos mantidos com interação social e enriquecimento ambiental (brinquedos) com aqueles mantidos apenas com interação social.

Para Van Loo, Van de Weerd e Baumans (1996), o enriquecimento ambiental pode ser um meio de satisfazer as necessidades dos animais uma vez que gaiolas padronizadas são projetadas para atender a demanda de espaço a baixo custo. Em seus estudos, grupos de camundongos fêmeas de duas linhagens diferentes tiveram um objeto (abrigo) colocado em suas gaiolas e seu comportamento acompanhado durante um período de cinco semanas. Em curto prazo o objeto influenciou a exploração do meio ambiente, o que pode ser correlacionado com o bem-estar. Em longo prazo a exploração diminuiu, entretanto, a interação aumentou, pois o objeto foi utilizado como refúgio. Desta forma, o abrigo demonstrou ser uma forma simples e aplicável de melhorar o ambiente.

Manser et al. (1998) colocaram diferentes abrigos dentro das gaiolas de ratos e verificaram que estes os utilizavam especialmente se forneciam proteção à luminosidade, o que explicou a preferência dos animais por abrigos de material opaco ou semi-opaco.

Coviello-Mclaughlin e Starr (1997) avaliaram diferentes objetos no enriquecimento ambiental de camundongos transgênicos e *Mus spretus*. Os materiais de enriquecimento foram ordenados de acordo com o tempo e modo de interação, demonstrando que, em ambas espécies, aumentou a interação dos animais pelos mesmos dois objetos (abrigo e material de ninho) dos seis introduzidos. No mesmo trabalho também transplantaram células tumorais humanas no tecido subcutâneo de camundongos da linhagem nude e observaram que a remoção dos pontos de sutura pelos animais foi mais demorada naqueles mantidos em ambientes enriquecidos o que caracteriza uma medida de bem-estar psicológico.

O tempo de interação de camundongos com alguns objetos foi maior em relação ao tempo gasto com outras atividades. Verificou-se que estes interagiram mais com um determinado tipo de objeto (ninho) do que com os outros dois estudados (túnel e esfera) (HOBBS; KOZUBAL; NEBIAR, 1997).

Segundo Anna, Olsson e Dahlborn (2002), modificações nas gaiolas de camundongos têm sido testadas para proporcionar um ambiente mais adequado, consistindo normalmente em fornecer material para construção de ninho e estruturas que podem servir como esconderijo e/ou para escalar. Após uma extensa revisão bibliográfica, os autores concluíram que o material de ninho deve ser incorporado às gaiolas, pois proporciona o desenvolvimento de comportamentos típicos da espécie e não apresenta conseqüências fisiológicas e comportamentais.

Quando Van de Weerd et al. (1998) testaram a opção de camundongos de ambos os sexos por diferentes objetos, com o objetivo de determinar qual o método mais eficiente de enriquecer gaiolas, concluíram que o ninho (lenço de papel) apresentou efeito positivo sobre os animais.

Sherwin (1997) pesquisou sobre a preferência de camundongos fêmeas entre dois materiais de ninho (fibra de celulose e pedaços de papel toalha). Na maioria das vezes, o ninho foi construído com uma mistura dos materiais porém, observações indicaram que houve uma preferência pelo papel toalha. Mais de 90% dos animais construíram seus ninhos durante a primeira fase escura e o local mais comum foi aquele onde dormiam antes da introdução dos materiais (embaixo do alimento).

Seis diferentes materiais de ninho foram avaliados com camundongos, machos e fêmeas, de duas linhagem diferentes: C57BL e BALB/c. Materiais de ninho derivados de papel foram preferidos quando comparados com aqueles derivados da madeira. Entretanto, os resultados sugerem que a natureza (papel ou madeira) é menos importante que sua estrutura (tiras, raspas, fios, etc), uma vez que esta determinará a facilidade com que estes animais construirão o ninho. Não houve diferença significativa entre os diferentes sexos e linhagens. Desta forma, a utilização de ninho pode ser um método de fácil introdução e relativamente simples para contribuir com o bem-estar. (VAN DE WEERD et al., 1997).

Segundo Eskola et al. (1999), ratos Wistar mantidos em gaiolas com enriquecimento ambiental (bloco e túnel de madeira) foram mais ativos em relação aos animais controles, apesar de demonstrarem crescimento igual. O tubo de madeira teve maior valor, pois foi utilizado não somente para roer mas também como abrigo. Os autores concluíram que o bloco e o túnel de madeira são econômicos, reutilizáveis e apropriados para o melhoramento do ambiente, além da vantagem de não introduzir nenhum componente novo ou extra na gaiola, uma vez que estes foram feitos com o mesmo material das camas.

Dahlborn et al. (1996) utilizaram duas linhagens de camundongos separados em grupos e colocados sob três diferentes condições: enriquecimento com objetos, com material de ninho e gaiola padrão (controle). Durante o estudo, os dois grupos com enriquecimento da linhagem C57 e o grupo com enriquecimento com objetos da linhagem Balb/C demonstraram uma redução na alimentação e uma maior atividade quando submetidos a testes. Amostras de urina foram coletadas para análise da proporção entre corticosterona e creatinina, sendo que nos camundongos onde objetos foram utilizados verificou-se aumento desta proporção, provavelmente decorrente da maior atividade. Avaliou-se também o peso corporal, morfologia da adrenal, proliferação de linfócitos e concentração de corticosterona no plasma após a eutanásia dos animais, mas não houveram diferenças significativas. Os autores recomendaram combinar testes comportamentais e análise de corticosterona na urina para avaliação dos efeitos do enriquecimento ambiental a longo prazo.

Chmiel e Noonan (1996) tentaram identificar entre quinze diferentes objetos quais proporcionavam um adequado estímulo e, conseqüentemente, algum grau de enriquecimento para ratos de laboratório. O bloco de madeira com orifícios foi o que

despertou maior interesse, pois permitiu o desenvolvimento de um comportamento típico da espécie: o de roer.

Kaliste-Korhonen et al. (1995) introduziram blocos de madeira em gaiolas com e sem material de cama utilizadas para acomodar ratos Wistar. A interação dos animais com o objeto, assim como a diferença de peso do bloco de madeira, ocasionada pelo ato de roer o mesmo, foram mínimas quando os animais eram mantidos em gaiolas com cama e aumentaram significativamente quando transferidos para aquelas sem cama. A presença dos blocos não alterou a ingestão de alimento, o ganho de peso corporal e os parâmetros comportamentais avaliados. Segundo os autores, a utilização do bloco de madeira reduz o estresse dos animais em gaiolas sem cama.

Eskola e Kaliste-Korhonen (1998) realizaram experimento semelhante e também observaram que os ratos roeram mais o bloco de madeira introduzido em gaiolas sem cama. No grupo de animais sem cama, o peso das glândulas adrenais aumentou, mas a concentração de corticosterona diminuiu. A presença do enriquecimento reduziu o ganho de peso nos dois tipos de gaiolas avaliadas (com e sem cama), além de resultar em animais mais ativos e menos tímidos. De forma similar ao que foi concluído acima, o bloco de madeira foi recomendado como um objeto de enriquecimento especialmente nas gaiolas sem material de cama.

Sherwin (1996) pesquisou a preferência de camundongos por diferentes modelos de canos introduzidos em gaiolas com e sem material de cama (maravalha) observando que os animais preferiram dormir sob a cama e, somente quando esta era removida, os camundongos dormiram nos canos. Quando a maravalha era recolocada na gaiola raramente os animais continuavam dormindo nos canos e, sempre que isto acontecia, o modelo escolhido era o mais largo. Não houve uma tendência significativa de utilizar mais canos opacos ao invés de canos transparentes. Contudo, o uso freqüente de estruturas tubulares para outros propósitos, como proteção ou latrina, indica que estas podem proporcionar um aumento adequado do bem-estar.

Ratos criados em ambientes enriquecidos parecem processar informações mais rapidamente e de forma mais complexa do que aqueles criados em gaiolas padronizadas (WOODCOCK; RICHARDSON, 2000) enquanto que a utilização de objetos na gaiola de ratos, fêmeas, gestantes exerce influência benéfica na capacidade de aprendizagem da progênie (KIYONO et al., 1985).

Através de testes comportamentais Manosevitz e Montemayor (1972) compararam camundongos de três linhagens diferentes nascidos em gaiolas

enriquecidas com aqueles criados em ambiente padrão (controle). Os resultados sugeriram que o enriquecimento aumenta a atividade dos animais e diminui a exploração.

Huck e Prince (1975) observaram que a influência do enriquecimento ambiental em testes comportamentais é maior em ratos selvagens do que nos domésticos. Segundo os autores, mudanças genéticas que acompanharam o processo de domesticação podem ter reduzido o impacto das mudanças ambientais nas respostas dos ratos domésticos.

Para Widman e Rosellini (1990), duas horas diárias de exposição a um ambiente enriquecido é o suficiente para produzir alterações no comportamento de ratos avaliados por testes de exploração a novos objetos. Os resultados obtidos foram semelhantes àqueles onde animais eram mantidos vinte e quatro horas por dia neste mesmo ambiente.

Henderson (1976) avaliou a performance de diferentes linhagens de camundongos em um teste de procura por alimento. Observou que quarenta e oito horas de exposição à gaiola enriquecida foi suficiente para produzir resultados iguais aqueles onde os animais foram mantidos neste mesmo ambiente desde o nascimento. Num segundo experimento, no mesmo trabalho, o autor utilizou somente uma linhagem de camundongo (C57BL) e concluiu que para produzir o máximo efeito do enriquecimento no mesmo teste citado o tempo de exposição prévia a um ambiente enriquecido é de seis horas.

2.2 Corticosterona

Uma extensiva lista de parâmetros fisiológicos de experimentos prévios foram re-analisados para avaliar o efeito do enriquecimento, tipo de gaiola, tamanho dos grupos e, conseqüentemente, o número de animais necessários em estudos com ratos Wistar. Os resultados indicaram que alguns parâmetros fisiológicos são susceptíveis a variabilidade atribuível às modificações ambientais, como os níveis de corticosterona, enquanto outras não. Os autores sugerem também que a variação dos diferentes parâmetros pode alterar de um experimento para o outro e entre ambientes diferentes. Os níveis de corticosterona variaram muito entre os indivíduos, o que aumentou o número de animais necessários. Além disso, medidas de corticosterona podem ser

sensíveis a erros devido à pequena quantidade de amostra sanguínea e/ou ao stress durante a colheita da mesma (MERING; KALISTE-KORHONEN; NEVALAINEN, 2001).

Para Dahlborn et al. (1996) a colheita de amostras sanguíneas é um procedimento estressante para camundongos e a realização da medição do nível de corticosterona na urina é o método mais adequado para estudos do efeito do enriquecimento ambiental a longo prazo.

Os resultados dos estudos de Belz et al. (2003) sustentam a idéia de que aspectos estruturais de um ambiente podem influenciar parâmetros fisiológicos e comportamentais dos animais. Ratos de ambos os sexos mantidos em gaiola com enriquecimento ambiental (objetos) tiveram significativa diminuição nas concentrações do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona, quando comparados com aqueles em gaiolas padronizadas. A interação com os objetos parece ter fornecido diversão, ocasionando menor atividade do eixo hipotálamo pituitária adrenal (HPA) antes e após estresse moderado. Esses resultados são importantes porque níveis basais estáveis e baixos, resultantes de um ambiente enriquecido, são essenciais para uma correta resposta do eixo HPA nas mais variadas áreas de pesquisa.

O eixo HPA é um dos principais mediadores da resposta endócrina não somente para o estresse, mas também para outros tipos de excitação emocional que podem requerer atividade, como, por exemplo, namoro, atividade sexual iminente e chegada do alimento. Quando o sistema nervoso central percebe algum fator causador de excitação, neurotransmissores no sistema límbico estimulam o hipotálamo a produzir fator liberador de corticotropina que, por sua vez, alcança a glândula pituitária sendo esta estimulada a liberar ACTH. Este hormônio na circulação estimula o córtex adrenal a secretar glicocorticóides cuja função é preparar o corpo para uma atividade física. O hormônio glicocorticóide predominante em primatas, cães, gatos e hamster Syrio é o cortisol, enquanto que outros roedores de laboratório produzem principalmente corticosterona. Quando o eixo HPA é ativado por estresse um aumento significativo nos níveis plasmáticos de glicocorticóides é observado aproximadamente 5 a 10 minutos após o início do estresse e níveis máximos até 20 minutos após em roedores. Alguns exemplos de fatores estressantes que comprovadamente aumentam os níveis dos glicocorticóides são: manejo, novo ambiente, contenção, choque elétrico, separação materno-infantil e conflitos agressivos (luta pela dominância) (MANSER, 1992).

Segundo File et al. (1993), ratos machos expostos a odor de gato têm concentrações plasmáticas de corticosterona significativamente maiores que aqueles expostos a odor neutro. Entretanto, camundongos machos criados em gaiolas com enriquecimento tiveram níveis menores de corticosterona em resposta a estresse provocado pelo odor de gato (fezes) e foram menos ansiosos que aqueles mantidos em ambientes padronizados (ROY et al., 2001).

Klein et al. (1994) também observaram menor ansiedade em ratos machos mantidos em ambientes enriquecidos quando em presença de estímulo estressante (urina de gato).

Armario, Montero e Balasch (1986) analisaram os níveis de corticosterona, glicose e lipídeos em ratos machos adultos submetidos a intensidades gradualmente aumentadas de estresse e concluíram que somente os primeiros dois parâmetros são sensíveis.

Dependendo da posição hierárquica adotada por camundongos machos mantidos em pequenos grupos e sob diferentes condições ambientais (com ou sem enriquecimento) podem ocorrer alterações comportamentais, endócrinas e sociais. Animais em gaiolas enriquecidas foram mais agressivos e instáveis na manutenção da dominância. Também apresentaram maiores níveis de corticosterona plasmática, principalmente camundongos dominantes, o que indica ser mais estressante manter a hierarquia nestas condições que em ambientes padronizados. (HAEMISCH; VOSS; GÄRTNER, 1994).

Segundo Stefanski (1998), a confrontação social crônica através da luta pela dominância de ratos machos introduzidos em gaiolas com outros animais de ambos os sexos atua como um severo estressor psicossocial, o qual provoca mudanças persistentes no sistema imune.

Alterações imunológicas semelhantes, em ratos machos dominantes e submissos, foram observadas após dois dias, mas não no sétimo de confronto. Desta forma, as persistentes alterações nos animais dominados podem refletir em condições menos favoráveis para uma resposta imune efetiva (STEFANSKI; ENGLER, 1999).

As diferenças endócrinas de ratos machos nos diferentes graus de hierarquia podem representar um papel crucial em algumas diferenças imunológicas observadas (STEFANSKI, 2000).

A presença de profissionais familiares aos animais, trabalhando nas salas dos laboratórios, não altera as características endócrinas, circulatórias e metabólicas desde

que as gaiolas onde estão acondicionados não sejam manipuladas (GÄRTNER et al., 1980).

Para Natelson et al. (1981), a corticosterona plasmática não é um indicador sensível de estresse. Os autores recomendam a análise de catecolaminas (epinefrina e noraepinefrina) como meio mais eficaz. Porém, em trabalho publicado em 1987, Natelson et al. reafirmaram suas conclusões anteriores, mas ressaltaram que sob outras condições e/ou períodos mais prolongados de estresse o nível de corticosterona no plasma sanguíneo pode ser considerado bom indicador.

Segundo pesquisa realizada por Ottenweller et al. (1992) para produzir estado de estresse crônico em ratos machos adultos são necessários três dias sob condição estressante (choque elétrico diário). O nível de corticosterona aumenta desde o primeiro dia de exposição, mas tanto esta variável como a perda de peso e o comportamento anormal avaliados têm mudanças significativas somente até o terceiro dia.

Avaliando a corticosterona plasmática como parâmetro bioquímico de estresse, Brown e Grunberg (1995) observaram que as condições da gaiola afetam estes níveis de forma diferente em ratos conforme o sexo. Machos apresentaram altos níveis de corticosterona sob condições de restrição espacial, já as fêmeas somente quando alojadas individualmente. Desta forma, viver sozinha parece ser a causa de estresse nas fêmeas, enquanto que os machos são mais afetados por um espaço restrito que pelo número de animais no ambiente.

Ratos Wistar fêmeas expostas a corticosterona durante a lactação apresentam filhotes de ambos os sexos com respostas neuroendócrinas e comportamentais similares, embora o efeito de alguns aspectos do eixo hipotálamo pituitária adrenal seja gênero dependente (CATALANI et al., 2002).

2.3 Cicatrização

A origem do estresse e da dor em animais de experimentação, submetidos a um procedimento cirúrgico, se deve não somente por isso, mas também pelo manejo e condições de acomodações inadequadas no pós-operatório. Os níveis de interferência fisiológica destes fatores podem ser avaliados antes e durante o experimento. A duração da dor após cirurgia depende do tipo e de sua localização, devendo estes fatores serem

levados em consideração na escolha do analgésico. A observação de sinais como peso corporal, consumo de alimento e água, temperatura corporal, fezes, urina, vocalização e alterações comportamentais, entre outros, podem identificar a presença de estresse e/ou dor. Outros parâmetros como bioquímicos, urinários e hematológicos, particularmente os níveis de ACTH, corticosterona, catecolaminas e esteróides sexuais, também são considerados nestes animais (MARTINI et al., 2000).

Nos últimos anos ocorreram avanços consideráveis para o entendimento dos processos bioquímicos e fisiológicos relacionados à cicatrização de feridas cutâneas. Em adultos saudáveis este processo normalmente envolve três estágios: (a) fase inflamatória envolvendo agregação plaquetária, coagulação sanguínea e migração de células inflamatórias para a ferida, (b) fase proliferativa, envolvendo migração e proliferação de células para a reepitelização e formação do tecido de granulação, e (c) uma extensa fase de remodelagem (PADGETT; MARUCHA; SHERIDAN, 1998). A retração das feridas cutâneas é o processo pelo qual as margens da lesão se contraem ao mesmo tempo resultando em um movimento centrípeto da pele íntegra adjacente em direção ao centro do defeito. Este fenômeno é fundamental para uma cicatrização em segunda intenção, produzindo uma ferida cicatricial muito menor que o defeito original. Desta forma, segundo Mott, Clark e Stelljes (2003), a localização da ferida é o fator mais importante para o resultado estético final.

Modelos experimentais na investigação da cicatrização são descritos em humanos e animais de laboratório (CROSS et al., 1995). Entretanto, os roedores são atraentes candidatos no estudo do reparo das feridas, devido a sua disponibilidade, baixo custo e fácil manejo (GALIANO et al., 2004).

Para analisar o progresso de reparo em todas as camadas das feridas excisionais da pele, sob uma variedade de tratamentos, uma combinação de observações macroscópicas, histopatológicas, bioquímicas e também medições da área superficial do defeito residual, em um determinado período de tempo, têm sido utilizadas (CROSS et al., 1995).

Eurides, Faria e Vitor (1985) removeram uma área de 4,5 x 4,5 cm de pele e tecido subcutâneo na face lateral do tórax e abdome de cães e, após, realizaram medições das bordas das feridas de três em três dias, até cicatrização completa. Concluíram que o método utilizado para remoção da pele e as tomadas de medidas com régua graduada mostrou-se eficiente na observação do processo de mobilização das bordas das feridas. Em experimento com procedimento cirúrgico semelhante, Vieira et

al. (2001) realizaram duas excisões circulares, a cada lado da região dorsal (flanco superior esquerdo e direito), de cobaias albinas, removendo-se dois centímetros de diâmetro de pele e tecido subcutâneo para testar diferentes pomadas cicatrizantes. As medidas das bordas das feridas foram realizadas com auxílio de paquímetro, a cada três dias, e após dezoito dias da excisão cirúrgica os animais foram sacrificados para avaliação histopatológica da cicatrização.

Todas as feridas ou incisões da pele, sejam elas ocluídas com suturas ou tratadas como feridas abertas, passam pela mesma seqüência de eventos químicos e celulares observados na cura destas em outros tecidos (ELLISON, 1996) porém, quando este processo é interrompido, ocorrem alterações na cicatrização (PADGETT; MARUCHA; SHERIDAN, 1998).

Há muitos fatores, tanto endógenos quanto exógenos, com potencial para afetar a cicatrização, mas apenas alguns deles são de importância clínica. Os fatores locais da ferida são, de longe, os mais importantes para que seja determinado se ocorrerá cicatrização não complicada. A remoção incompleta do tecido desvitalizado ou corpos estranhos, a contaminação bacteriana residual, a manipulação descuidada dos tecidos, e cuidados pós-operatórios inadequados são causas de retardo, ou de ruptura das feridas. A desnutrição crônica (depleção protéica) e moléstias sistêmicas, são exemplos de fatores endógenos que podem influenciar negativamente a cicatrização das feridas (ELLISON, 1996).

Para Slominski e Wortsman (2000) a comunicação multidirecional entre a pele e o sistema endócrino, imune e nervoso central sugere que esta pode ser um importante regulador da homeostasia global, atuando como um sensor de distúrbios externos e internos. Portanto, os autores sugerem que o sistema neuroendócrino da pele atua preservando e mantendo a integridade funcional e estrutural desta e, conseqüentemente, a homeostasia sistêmica.

O estresse crônico pode causar retardo na cicatrização, pois provoca um desequilíbrio no eixo hipotálamo pituitária adrenal, responsável pela produção do hormônio glicocorticóide que afeta muitos componentes da resposta inflamatória. A hipótese de que o estresse leva a uma alteração na resposta dos glicocorticóides, resultando em hipersecreção ou elevação prolongada da corticosterona no plasma e, dessa forma, limita a ativação do processo inflamatório necessário para uma eficiente cicatrização foi testada por Padgett, Marucha e Sheridan (1998). Camundongos, fêmeas de seis a oito semanas de idade, apresentaram elevação nos níveis de corticosterona

sérica quando submetidas a estresse por restrição de espaço (imobilização) assim como uma cicatrização mais demorada. Portanto, a redução da inflamação e o retardo na cicatrização correlacionam-se com os níveis séricos de corticosterona, sugerindo que uma interrupção na homeostasia neuroendócrina regula o processo de reparo das feridas.

Segundo Ellison (1996), a tensão prolongada ou a repetida administração sistêmica de doses elevadas de esteróides retarda a cicatrização, particularmente no caso da administração destes agentes antes, ou por ocasião da realização das feridas. Níveis elevados de esteróides inibem a fase inflamatória da cicatrização, através do decréscimo do acúmulo, e da capacidade fagocitária dos leucócitos polimorfonucleares e macrófagos na ferida. Os esteróides também reduzem a proliferação de fibroblastos e a síntese do colágeno. Doses elevadas de esteróides limitam o brotamento capilar e diminuem a velocidade de epitelização. A tensão e esforço agudo ou doses isoladas de esteróides não têm efeito sobre o reparo das feridas. Em geral, a administração de doses mais elevadas de esteróides reduz, mas não inibe completamente, a cicatrização.

Rojas et al. (2002) observaram, nos resultados dos seus estudos, que o estresse aumenta a suscetibilidade a infecções de feridas cutâneas por bactérias oportunistas como *Staphylococcus aureus*. Camundongos, fêmeas, submetidas a estresse por restrição de espaço, apresentaram retardo na cicatrização e diminuição da resposta imune e inflamatória necessária para a eliminação bacteriana.

Pesquisa realizada por Kinsey, Prendergast e Nelson (2003) concluiu que mudanças no fotoperíodo influenciam o sistema imune de Hamsters siberiano, machos, refletindo na sua capacidade de reparo de feridas cutâneas. Animais acondicionados em gaiolas sob um fotoperíodo de 16 horas claro e 8 horas escuro apresentaram uma cicatrização significativamente mais rápida que aqueles sob 8 horas claro e 16 horas escuro. Entretanto, quando submetidos a estresse agudo por restrição de espaço, o reparo da ferida ocorreu de forma mais acelerada naqueles sob períodos curtos de luminosidade.

O estresse pode afetar também muitos aspectos da imunidade celular, sendo que esta apresenta papel significativo na regulação da cicatrização. Desta forma, segundo Kiecolt-Glaser et al. (1995), o estresse relacionado a defeitos no reparo de feridas pode ter implicações clínicas importantes como, por exemplo, na recuperação cirúrgica.

Está bem documentado que estresse psicológico prejudica a cicatrização em humanos e roedores. Hamsters siberiano expostos a um estresse crônico por imobilização, alojados em gaiolas com interação social, apresentaram uma melhor

cicatrização, assim como níveis reduzidos de cortisol quando comparados com aqueles mantidos individualmente. Assim, o isolamento social torna o animal mais suscetível ao estresse, prejudicando a cicatrização e aumentando o risco de infecção das feridas cutâneas. (DETILLION et al., 2004).

Nirgiotis et al. (1991 apud Gupta, Manhas e Raghubir, 2004) demonstraram que dietas ricas em carboidratos melhoraram a cicatrização em ratos cirurgicamente estressados. Células cutâneas dependem do metabolismo de carboidratos para obter energia suficiente no reparo de feridas. Porém, este processo pode ser impedido durante uma variedade de condições patológicas e psicológicas. Alterações na atividade das enzimas que metabolizam energia no tecido de granulação, tanto de ratos idosos como de imunodeficientes, podem afetar especialmente a energia disponível para as atividades celulares necessárias na cicatrização. Conseqüentemente, este pode ser o fator responsável pela cicatrização prejudicada nestes animais (GUPTA; MANHAS; RAGHUBIR, 2004).

Embora historicamente a cicatrização nos idosos seja considerada defectiva, existe um consenso atual de que em idade avançada esta encontra-se retardada, sendo o resultado final qualitativamente similar ao que ocorre nos jovens. (GOSAIN; LUIZA; DiPIETRO, 2004).

Contudo, a consideração mais importante, em um estudo sobre a cicatrização de feridas cutâneas, pode ser resumida por uma simples afirmação: a pele é um órgão altamente complexo, contendo múltiplas estruturas derivadas de diferentes camadas celulares. Desta forma, manipulações químicas e físicas que podem ser realizadas em feridas cutâneas, bem como, a base biológica para o sucesso do tratamento (PEACOCK; VAN WINKLE, 1970) da cicatrização das mesmas, é uma área da medicina que recentemente vem demonstrando muitos avanços (RUSZCZAK; SCHWARTZ, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

Verificar a redução no tempo de cicatrização pós-cirúrgica em ratos Wistar mantidos em ambientes enriquecidos.

3.2 Específicos

Observar a influência do enriquecimento ambiental em ratos Wistar submetidos a procedimento cirúrgico avaliando:

- nível de corticosterona em até quatro semanas após a cirurgia;
- tempo de cicatrização, pela regressão do tamanho da ferida cirúrgica, e posterior análise histopatológica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Utilizaram-se 64 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, de padrão sanitário convencional, com 2 meses de idade, pesando em média 200 gramas, procedentes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.2 Local

Os animais foram mantidos no setor de experimentação do CREAL, em sala privativa (12 m²), dotada de controle de temperatura, umidade e fotoperíodo. A temperatura e umidade foram controladas por meio de condicionamento de ar enquanto que o fotoperíodo (12 horas claro e 12 horas escuro) foi obtido pelo uso de um aparelho tipo timer (Timer HASA 207[®]). Os animais foram alojados em gaiolas com dimensões de 340 mm de largura X 490 mm de comprimento X 160 mm de altura e submetidos às condições padrões de manejo do CREAL, ou seja, a cama, constituída por maravalha de pinus previamente esterilizada por calor úmido, era trocada três vezes por semana e o fornecimento de água e ração comercial peletizada *ad libitum*. Os animais foram aclimatados neste ambiente sete dias antes da realização do procedimento cirúrgico.

4.3 Grupos

Os animais foram divididos em 4 grupos sendo que:

- Grupo 1 (G1): sem procedimento cirúrgico e sem enriquecimento ambiental;
- Grupo 2 (G2): com procedimento cirúrgico e sem enriquecimento ambiental;

- Grupo 3 (G3): com procedimento cirúrgico e com enriquecimento ambiental (mobiliário);
- Grupo 4 (G4): com procedimento cirúrgico e com enriquecimento ambiental (interação social).

4.4 Procedimento Cirúrgico

O procedimento cirúrgico foi realizado sob anestesia com xilazina e cetamina na dosagem de 10 mg/Kg e 75 mg/Kg respectivamente, administradas por via intraperitoneal (FLECKNELL, 1996). Em seguida, procedeu-se ampla tricotomia, com máquina de tosa e lâmina 40, na região tóraco-lombar dorsal de todos os animais utilizados. Para anti-sepsia utilizou-se clorexidina 4% e a seguir delimitou-se o campo operatório com pano de campo esterilizado. O tamanho da ferida a ser realizada foi desenhado através da impressão na pele do diâmetro de uma seringa de 10 ml tingida de azul de metileno, sendo o diâmetro confirmado através de paquímetro (média 2,55 cm). Após delimitação, a excisão da pele e tecido subcutâneo foi realizada com bisturi, lâmina 23 e tesoura de Metzenbaum. A Figura 1 representa esquematicamente o local da incisão na região tóraco-lombar dorsal dos animais submetidos ao procedimento cirúrgico.

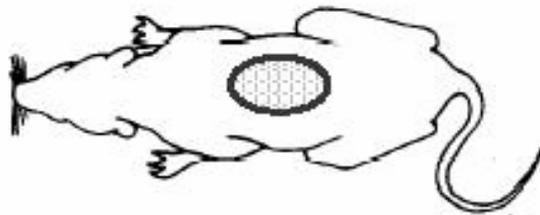


Figura 1 – Diagrama mostrando região tóraco-lombar dorsal onde foi removido retalho de pele e tecido subcutâneo do animal.

4.5 Técnicas de Enriquecimento

Neste experimento utilizaram-se duas técnicas de enriquecimento ambiental: mobiliário e interação social. Na primeira, diferentes mobiliários (iglu, bloco de madeira e cilindro) foram colocados de forma sequencial nas gaiolas. O iglu (BioServ Corporation, USA), era de coloração preta, com diâmetro de 15 cm e altura de 8 cm no ponto mais central (Figura 2A). O bloco de madeira consistia de cubo de madeira cedro com aresta de 6 cm, possuindo ao centro de cada face um furo com aproximadamente 1,9 cm (Eskola et al., 1999) (Figura 2B). O cilindro foi confeccionado a partir de um cano de policloreto de vinila (PVC) com comprimento de 16 cm e diâmetro de 7,5 cm (Figura 2C). A segunda técnica consistiu na introdução de outro rato, macho, com a mesma idade e peso dos utilizados no experimento com a finalidade de promover a interação social dos animais.



Figura 2 – Tipos de enriquecimentos ambientais utilizados (A: iglu, B: cubos, C: cilindros).

4.6 Coleta de Sangue

A obtenção de amostras de sangue teve por objetivo mensurar os níveis de corticosterona dos animais ao início do experimento (dia da cirurgia) e à medida que cada grupo de animais era eutanasiado (aos 7, 14, 21 e 28 dias, conforme procedimento experimental). Após o procedimento anestésico descrito no item 4.4, os animais eram colocados em decúbito dorsal para coleta de sangue por punção cardíaca realizada lateralmente à parede torácica, pela introdução de agulha 25 x 7 entre a quinta e sexta costela à esquerda do esterno. Após a coleta, as amostras contendo aproximadamente

1,5 ml de sangue foram colocadas em repouso para obtenção do soro, em seguida, centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos e, então, o soro recolhido e mantido em frascos de ependorff a -20°C até a análise.

4.7 Dosagem de Corticosterona

A análise do nível de corticosterona no sangue foi realizada na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC). As dosagens de corticosterona foram feitas por radioimunoensaio (RIA) com kit produzido por MP-Biomedicals (ICN Pharmaceuticals, INC, Costa Mesa, CA, USA). A sensibilidade é de 5 ng/ml e a precisão intra-ensaio de 8% e entre-ensaio de 12,5%.

4.8 Coleta do Fragmento de Pele

Para a coleta dos fragmentos de pele em processo de cicatrização, os animais eram previamente eutanasiados pela administração de uma dose letal de tiopental sódico 2,5%, via intraperitoneal. A seguir, eram colocados em decúbito ventral e então feita a excisão de um segmento de pele e tecido subcutâneo, de diâmetro aproximado de 3 centímetros. O material coletado era armazenado e estocado em recipiente contendo aproximadamente 60 ml de solução de formaldeído a 10% até o seu processamento histológico no laboratório de patologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF)- RS.

4.9 Avaliação Histopatológica

O preparo do material, para avaliação histopatológica da cicatrização, foi realizado conforme rotina do laboratório de patologia da FAMV da UPF. O fragmento de tecido da região em cicatrização foi processado conforme as técnicas histológicas de rotina, e

foram confeccionadas duas lâminas: uma corada com hematoxilina e eosina (HE) e outra com tricômio de masson. Em um primeiro momento, as amostras foram analisadas por microscopia óptica em duas leituras cegas onde não era identificado o grupo ao qual pertenciam. Os resultados registrados através de análise semiquantitativa avaliaram as presenças de tecido conjuntivo, células inflamatórias polimorfonucleadas (PMN) e mononucleadas, neovascularização e presença de crostas (fibrina + PMN) em graus que variaram de: ausente (-), presença leve (+), presença moderada (++) e presença acentuada (+++). Posteriormente, foram atribuídos escores, que variaram de 0 (atípico), 1 (ruim), 2 (razoável), 3 (bom) e 4 (ótimo), para cada um dos itens acima mencionados considerando a fase em que o processo cicatricial se encontrava e se o parâmetro observado estava em conformidade com o esperado para aquela fase da cicatrização. Assim, foi calculada a média dos cinco parâmetros avaliados, resultando em um escore final para cada animal.

4.10 Procedimento Experimental

No primeiro dia, todos os animais dos quatro grupos foram anestesiados, conforme descrito anteriormente, para a coleta de 1,5 ml de sangue por via intracardíaca e posterior análise do nível de corticosterona. Após a coleta e tricotomia da região dorsal, os animais do grupo G1 receberam cetoprofeno 5 mg/Kg por via subcutânea e, em seguida, recolocados em suas gaiolas. Os grupos G2, G3 e G4 sofreram procedimento cirúrgico (conforme item 4.4) e no pós-operatório receberam cetoprofeno na mesma dose e via do grupo G1. No dia 2, os quatro grupos receberam outra dose de cetoprofeno. A ferida cirúrgica dos grupos G2, G3 e G4, bem como a pele íntegra do grupo G1, foi limpa diariamente com cloreto de sódio 0,9%. No dia do procedimento cirúrgico, o primeiro tipo de mobiliário (iglu) foi introduzido nos grupos G3, assim como o segundo animal na gaiola dos grupos G4 (enriquecimento por interação social). A avaliação macroscópica do diâmetro da ferida cirúrgica e a evolução da cicatrização no decorrer do experimento foi feita com o auxílio de paquímetro nos grupos G2, G3 e G4 duas vezes por semana.

Semanalmente, quatro animais de cada grupo eram anestesiados para coleta de sangue e após eutanasiados com uma dose letal de tiopental sódico 2,5% por via

intraperitoneal, de forma que as amostras sanguíneas eram coletadas na primeira, segunda, terceira e quarta semana após o início do experimento em cada grupo de animais. Em seguida, um fragmento de tecido com aproximadamente 3 cm de diâmetro, da região em cicatrização, era coletado nos grupos G2, G3 e G4 e armazenado em formaldeído 10% para posterior análise histopatológica.

O enriquecimento ambiental com mobiliário (Figura 3) foi introduzido alternadamente nos dias 0 (iglu), 3 (bloco), 7 (cano), 10 (iglu), 14 (bloco), 17 (cano), 21 (iglu), e 24 (bloco). A medição da cicatrização com paquímetro foi realizada nos dias 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 e 28. A coleta de sangue para análise da corticosterona foi efetuada nos dias 0, 7, 14, 21, e 28 e a coleta de material para análise histopatológica nos dias 7, 14, 21, e 28. O segundo animal foi introduzido na gaiola do grupo G4 no dia da cirurgia e permaneceu até a data da eutanásia do mesmo.

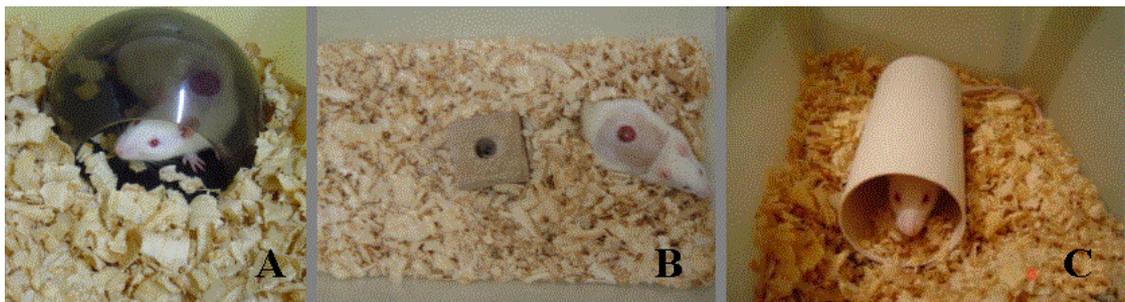


Figura 3 - Interação com o enriquecimento ambiental com mobiliário: iglu (A), cubo (B), cilindro (C).

4.11 Número de Amostras Analisadas

Inicialmente, cada grupo era composto por 16 animais. Semanalmente, quatro animais de cada grupo eram eutanasiados para a análise histopatológica da cicatrização e coleta de sangue para dosar o nível de corticosterona. Desta forma, para observação macroscópica do processo de cicatrização, o número de animais decrescia a cada semana em múltiplos de quatro (Tabela 1). O grupo G1 (sem procedimento cirúrgico e sem enriquecimento ambiental) foi utilizado apenas como controle para o nível de

corticosterona não sendo considerado na avaliação macroscópica do processo de cicatrização e na análise histopatológica, uma vez que não sofria intervenção cirúrgica.

Tabela 1 – Número de amostras analisadas por grupo a cada semana de observação macroscópica do processo de cicatrização. Porto Alegre, 2005.

Grupo	N (total)	Amostras Analisadas			
		Semana			
		1 ^a .	2 ^a .	3 ^a .	4 ^a .
G1	16	16	12	8	4
G2	16	16	12	8	4
G3	16	16	12	8	4
G4	16	16	12	8	4

Grupo G1 (sem procedimento cirúrgico e sem enriquecimento ambiental), utilizado apenas como controle no experimento de dosagem de corticosterona; Grupo G2 (com procedimento cirúrgico e sem enriquecimento ambiental); G3 (com procedimento cirúrgico e enriquecimento com mobiliário); G4 (com procedimento cirúrgico e enriquecimento com interação social).

4.12 Cronograma de Execução

A execução do experimento foi realizada conforme Figura 4.

0*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
										1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
E		E					E			E				E						E			E						E
C							C							C						C									C
			P				P			P				P						P			P						P
							H							H						H									H
							M							M						M									M

Figura 4 – Cronograma de execução. Números: Dias, * : Procedimento cirúrgico, E: Enriquecimento ambiental, C: Dosagem corticosterona, P: Medição com paquímetro, H: Coleta de material para histopatologia, M: Eutanásia dos animais

4.13 Análise Estatística

Os testes estatísticos foram executados utilizando-se o programa SPSS versão 8.0 e realizados no Núcleo de Estatística Aplicada do Departamento de Estatística do Instituto de Matemática da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O teste de análise de variância (não paramétrico de ANOVA Tukey) foi empregado para analisar as possíveis diferenças entre as médias obtidas para os seguintes parâmetros: avaliação macroscópica da cicatrização, níveis séricos de corticosterona e avaliação histopatológica.

Na análise estatística da avaliação macroscópica da cicatrização foi utilizado delineamento de Split-plot cujo fator de parcela principal foi o fator grupo e na sub parcela o fator dia. O fator grupo teve três níveis (G2, G3 e G4) e o fator dia nove (0, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24 e 28). Delineamento de medidas repetidas via proc mixed do SAS foi utilizado para analisar os dados dos níveis de corticosterona. O fator grupo teve quatro níveis (G1, G2, G3 e G4) e o fator dia cinco (0, 7, 14, 21 e 28). Para a avaliação histopatológica o delineamento foi análise de variância (ANOVA) fatorial com dois fatores. O fator grupo teve três níveis (G2, G3 e G4) e o fator dia quatro (7, 14, 21 e 28). Os dados da avaliação histopatológica apresentaram heterogeneidade de variância sendo que a transformação de mínimos quadrados foi utilizada para estabilizar ou homogeneizar a variabilidade. Utilizou-se a variância dos grupos para compor a ponderação que a técnica de mínimos quadrados necessita.

Para todos os testes estabeleceu-se o valor de 0,05 como nível de rejeição da hipótese de nulidade (p).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação Macroscópica do Processo de Cicatrização

A avaliação macroscópica do processo de cicatrização foi realizada conforme descrito no item 4.10 do material e métodos e encontra-se na Tabela 2 e ilustrada na Figura 5. Os resultados obtidos, através de teste de comparações múltiplas de Tukey a 5% de significância, demonstraram que não existiu diferença estatística significativa em relação às áreas de ferida entre os grupos analisados (G2, G3 e G4) dentro do mesmo dia de observação. Os dados obtidos indicaram que os animais mantidos em ambientes enriquecidos não apresentaram redução no tempo de cicatrização, todavia, mesmo sem diferença estatística, somente o grupo G4 (com procedimento cirúrgico e enriquecimento por interação social) apresentou a ferida cirúrgica totalmente cicatrizada no vigésimo quarto dia após a cirurgia.

Tabela 2 – Percentual de área de ferida cirúrgica em relação à área inicial por dia de experimento em cada grupo. Média \pm desvio-padrão. Porto Alegre, 2005.

Dia	Área (%)		
	G2	G3	G4
0	100 \pm 3,96	100 \pm 2,26	100 \pm 3,98
4	94,83 \pm 7,86	96,30 \pm 12,03	94,07 \pm 11,20
7	60,72 \pm 9,55	63,35 \pm 14,86	60,08 \pm 10,23
10	31,62 \pm 7,41	34,98 \pm 8,70	33,98 \pm 11,74
14	12,66 \pm 4,86	14,19 \pm 5,87	11,03 \pm 4,90
17	4,20 \pm 2,55	5,65 \pm 4,72	4,02 \pm 2,40
21	0,93 \pm 1,09	2,22 \pm 3,34	0,67 \pm 1,33
24	0,08 \pm 0,16	0,70 \pm 1,40	0,00 \pm 0,00
28	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

Não houve diferença significativa para o teste de ANOVA Tukey ($p > 0,05$)

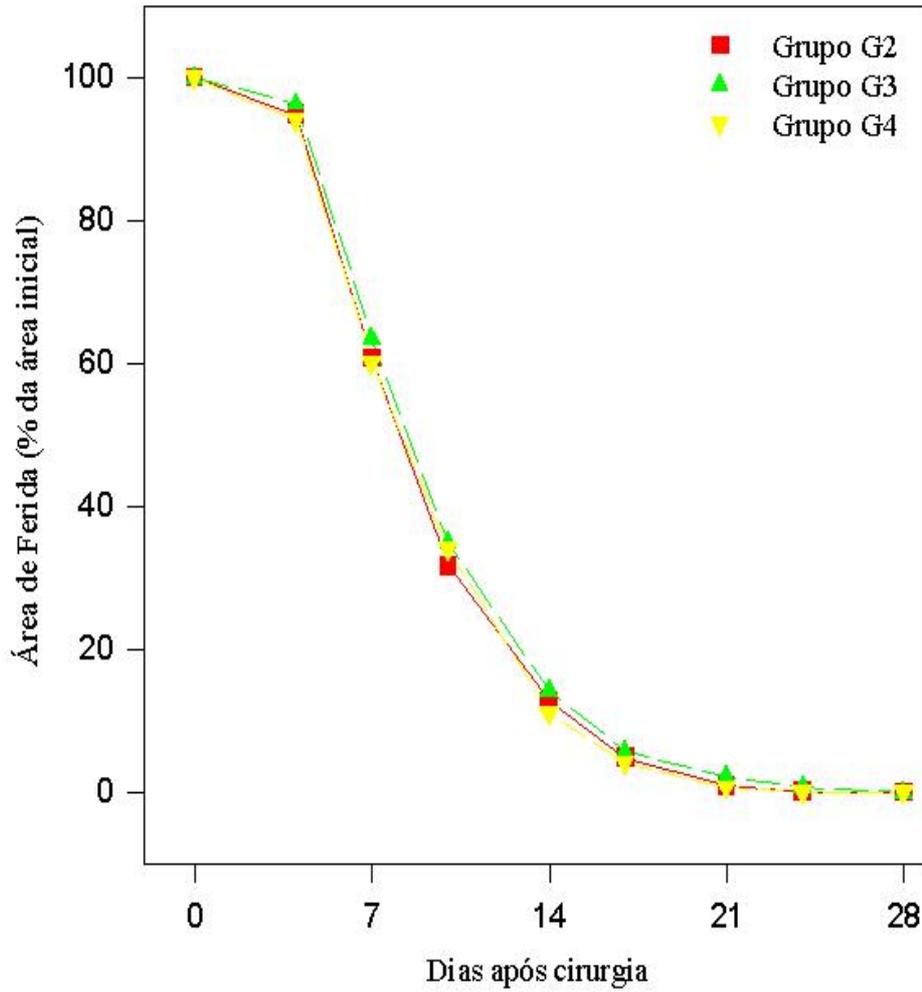


Figura 5 - Percentual de área da ferida cirúrgica remanescente em relação à área inicial por dia de experimento em cada grupo. Os dados estão expressos em média \pm desvio-padrão da área em porcentagem.

5.2 Análise Histopatológica

A avaliação histopatológica dos fragmentos de pele foi realizada conforme descrito no item 4.9 do material e métodos. Considerando os dados apresentados na Tabela 3 e representados na Figura 6, conforme teste de comparações múltiplas de Tukey a 5% de significância, houve diferença significativa ($p=0,0064$) para escore médio de cicatrização, quando foi analisada a interação entre semana e grupo (G2, G3 e G4).

Na primeira, terceira e quarta semana não houve diferença significativa entre as médias dos grupos (G2, G3 e G4). Na segunda semana, observou-se diferença significativa entre as médias do grupo com procedimento cirúrgico e sem enriquecimento ambiental (G2) e o grupo com procedimento cirúrgico e enriquecimento ambiental com mobiliário (G3) sendo que, o grupo G3 apresentou uma melhor cicatrização quando comparado ao G2. O grupo com procedimento cirúrgico e enriquecimento ambiental por interação social não diferiu significativamente desses grupos.

Tabela 3 – Escores médios da avaliação histopatológica de fragmentos de pele e tecido subcutâneo em cada semana após cirurgia por grupo. Média \pm desvio-padrão. Porto Alegre, 2005.

Grupo	N	Escore Final (média \pm desvio-padrão)			
		Semana			
		1 ^a .	2 ^a .	3 ^a .	4 ^a .
G2	16	3,25 \pm 0,05	2,00 \pm 0,37 ^a	2,73 \pm 0,07	2,90 \pm 0,10
G3	16	2,75 \pm 0,13	3,30 \pm 0,13 ^b	2,45 \pm 0,22	2,40 \pm 0,76
G4	16	2,80 \pm 0,22	2,95 \pm 0,46 ^{ab}	2,95 \pm 0,38	3,00 \pm 0,33

Letras diferentes **a**, **b** na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos na mesma semana para teste de ANOVA Tukey ($p < 0,05$).

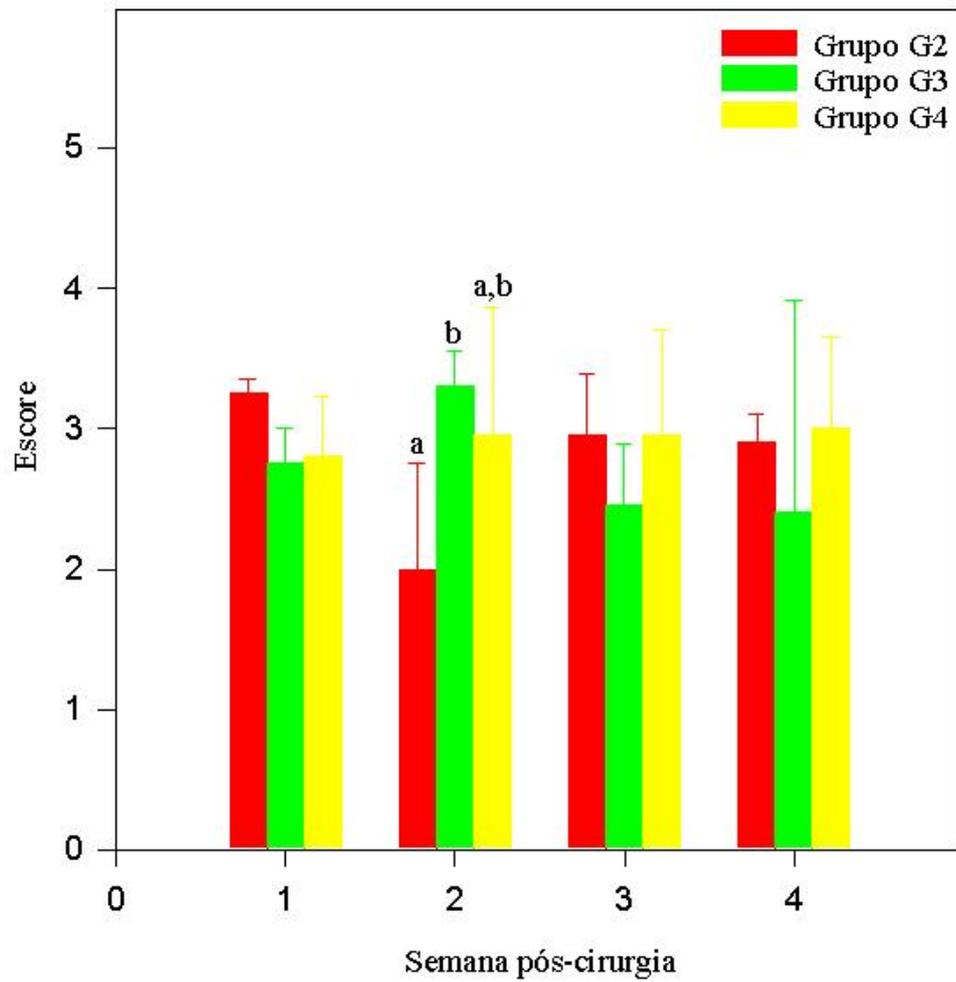


Figura 6 - Escores médios da avaliação histopatológica de fragmentos de pele em cada semana após cirurgia por grupo. Os resultados estão expressos em média \pm desvio-padrão. Letras diferentes **a**, **b** indicam diferença significativa entre os grupos na mesma semana.

5.3 Níveis de Corticosterona

Os níveis de corticosterona encontram-se na Tabela 4 e ilustrados na Figura 7 e foram quantificados segundo metodologia descrita no item 4.7 do material e métodos.

Tabela 4 – Níveis de corticosterona por semana em cada grupo. Média \pm desvio-padrão. Porto Alegre, 2005.

Semana	Corticosterona (ng/ml)			
	G1	G2	G3	G4
0	363,25 \pm 41,34	347,24 \pm 41,34 ^B	424,81 \pm 41,34	325,19 \pm 41,34
1	238,47 \pm 82,68 ^b	794,48 \pm 82,68 ^{A a}	320,82 \pm 82,68 ^b	292,88 \pm 82,68 ^b
2	360,40 \pm 82,68	347,71 \pm 82,68 ^B	246,29 \pm 82,68	193,18 \pm 82,68
3	432,90 \pm 82,68	513,62 \pm 95,47 ^{AB}	409,44 \pm 82,68	329,70 \pm 82,68
4	307,72 \pm 82,68	258,57 \pm 82,68 ^B	253,95 \pm 82,68	284,11 \pm 82,68

Letras diferentes **a, b** na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos na mesma semana. Letras diferentes **A, B** na mesma coluna indicam diferença significativa entre semanas no mesmo grupo para teste de ANOVA Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

Segundo o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer a 5% de significância observou-se diferença significativa do grupo G2 com os demais grupos (G1, G3 e G4) apenas na primeira semana. Este resultado indicou que os animais submetidos à cirurgia e mantidos em ambientes enriquecidos no pós-operatório apresentaram níveis de corticosterona similares àqueles que não sofreram intervenção cirúrgica. A partir da segunda semana até a completa cicatrização, não se observou diferença estatística entre os grupos.

O grupo G2 apresentou diferença significativa nas diferentes semanas uma vez que o nível de corticosterona foi significativamente maior na primeira quando comparado com a segunda e a quarta. Entretanto, não houve diferença significativa na terceira semana.

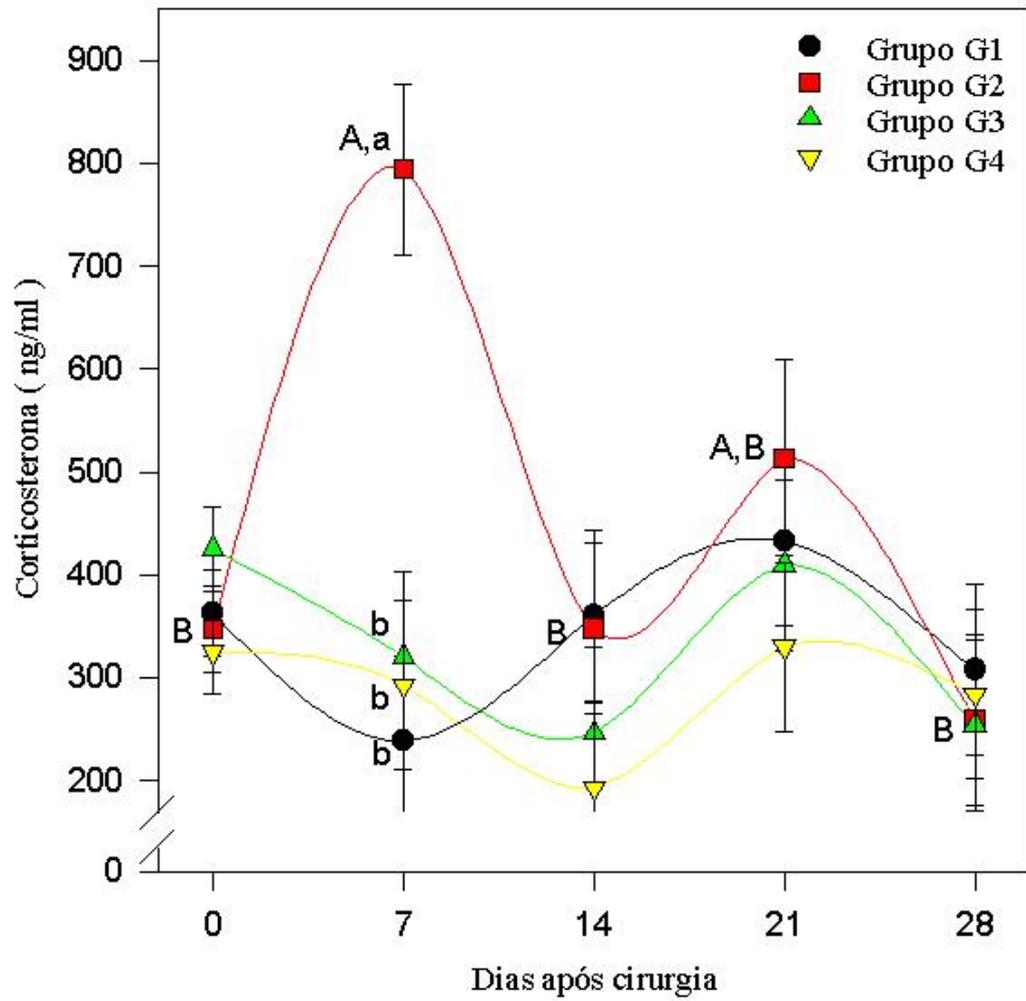


Figura 7 - Níveis de corticosterona por semana em cada grupo. Os resultados estão expressos em média \pm desvio-padrão.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho utilizou-se um conjunto de observações macroscópicas, histopatológicas e bioquímicas para analisar a influência do enriquecimento ambiental no progresso cicatricial de feridas excisionais da pele, conforme recomendado por Cross et al. (1995).

Mesmo que o objetivo principal não tenha sido avaliar ratos Wistar como modelos experimentais para observação da cicatrização, as afirmações descritas por Galiano et al. (2004), que roedores são animais adequados ao estudo do reparo das feridas devido a sua disponibilidade, baixo custo e fácil manejo, corroboraram e contribuíram para a exequibilidade do trabalho.

Desta forma, apesar do uso consagrado do rato nos estudos envolvendo a cicatrização da pele, poucos trabalhos se preocuparam em estimar o nível de estresse que os animais possam estar submetidos, embora, conforme Baumans e Van de Weerd (1996), vários métodos possam ser utilizados para essa finalidade.

Os resultados comprovaram que, embora as tomadas de medidas com paquímetro tenham se mostrado eficientes na observação do processo de mobilização das bordas das feridas, como encontrado por Eurides, Faria e Vitor (1985), não houve diferença estatística significativa na redução do tempo de cicatrização cutânea entre os animais mantidos ou não em ambientes enriquecidos, todavia, o grupo G4 (com procedimento cirúrgico e enriquecimento por interação social) apresentou a ferida totalmente cicatrizada no vigésimo quarto dia após a cirurgia, antecipando, assim, em quatro dias o processo cicatricial.

Desta forma, apesar dos resultados não demonstrarem diferença estatística significativa, observou-se que os animais em gaiolas com interação social apresentaram melhor cicatrização macroscópica quando comparados aos demais grupos analisados no experimento, indicando que esta técnica de enriquecimento ambiental teve interferência positiva no processo cicatricial, confirmando as afirmações de Van Loo et al. (2004) que a sociabilidade é importante para animais de laboratório e também de Detillion et al. (2004), que a diminuição do estresse favorece a cicatrização.

Portanto, diante dos resultados observados neste experimento e sabendo que o contato entre os animais de laboratório, bem como, o número destes por gaiola pode

influenciar respostas fisiológicas, comportamentais e imunológicas (PENG et al., 1989), é essencial considerar este fator como variável importante nos dados de uma pesquisa.

Na avaliação histopatológica da cicatrização, houve diferença significativa na segunda semana de experimento entre as médias avaliadas do grupo com procedimento cirúrgico e sem enriquecimento ambiental (G2) e o grupo com procedimento cirúrgico e enriquecimento ambiental com mobiliário (G3) sendo que, este último apresentou melhor cicatrização quando comparado ao primeiro, concordando com a afirmação de Batchelor (1994) que a introdução de objetos na gaiola também traz benefícios para os ratos. O grupo G3 teve sua gaiola enriquecida através da introdução, de forma seqüencial, de diferentes mobiliários (iglu, bloco de madeira e cano). A colocação do abrigo (iglu) e do cano na gaiola dos ratos demonstrou ser uma forma simples de melhorar o ambiente já que se observou uma interação significativa dos animais com estes mobiliários, utilizados não somente para dormir mas também como refúgio, de acordo com os resultados obtidos por Van Loo, Van de Weerd e Baumans (1996) e Sherwin (1996). O bloco de madeira com orifícios não foi o objeto que despertou maior interesse nos ratos, ao contrário do observado por Chmiel et al. (1996), mas permitiu o desenvolvimento de comportamento típico da espécie: o de roer.

Através de dosagens semanais dos níveis de corticosterona sanguínea, avaliou-se o estresse sob o qual os animais utilizados no experimento estavam submetidos, uma vez que, concentrações deste hormônio encontram-se elevadas em situações estressantes (MANSER, 1992) e, segundo Harris et al. (1999), esta é uma das maneiras de medir o bem-estar psicológico e deste modo os efeitos positivos do enriquecimento ambiental.

Os resultados da análise do nível de corticosterona demonstraram diferença significativa do grupo G2 com os demais grupos apenas na primeira semana, corroborando com resultados obtidos por De Boer, Slangen e Van Der Gugten (1988), que quando animais são submetidos à exposição contínua ao estresse ocorre uma adaptação dos níveis de corticosterona plasmática, resultante, segundo o autor, de um mecanismo inibitório da secreção deste hormônio por feedback, devido ao seu elevado nível na circulação.

O grupo G2 demonstrou também diferença significativa nas diferentes semanas, uma vez que o nível de corticosterona foi maior na primeira quando comparado com a segunda e a quarta. Entretanto, não houve diferença significativa na terceira semana.

Quando o eixo HPA é ativado por estresse um aumento significativo nos níveis plasmáticos de glicocorticóides é observado (MANSER, 1992), o que justificaria os

resultados do experimento nos quais os animais que sofreram procedimento cirúrgico e não foram submetidos a enriquecimento ambiental apresentaram níveis elevados de corticosterona, compatíveis com situação de estresse. Entretanto, ratos que sofreram cirurgia mas que foram mantidos em ambientes enriquecidos no pós-operatório tiveram níveis de corticosterona similares àqueles que não sofreram intervenção cirúrgica, sugerindo que as técnicas de enriquecimento adotadas diminuíram o estresse e, assim, reduziram as concentrações de corticosterona, confirmando as conclusões de Belz et al. (2003). Portanto, de acordo com Natelson et al. (1987), a dosagem do nível de corticosterona no plasma sanguíneo demonstrou ser um bom indicador para avaliar estresse.

7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos, nas condições em que foi conduzido este trabalho, nos permite as seguintes conclusões:

- a utilização do enriquecimento ambiental não altera o tempo de cicatrização pós-cirúrgica de ratos Wistar embora, a análise histopatológica qualitativa demonstrou que os animais submetidos ao procedimento e mantidos em ambientes sem enriquecimento tiveram, na segunda semana após a cirurgia, padrão morfológico inferior quando comparados àqueles mantidos com enriquecimento ambiental;
- o enriquecimento ambiental reduz o estresse pós-cirúrgico uma vez que o nível de corticosterona foi significativamente maior na primeira semana de pós-operatório nos animais não submetidos a técnicas de enriquecimento e também porque animais mantidos em ambientes enriquecidos apresentaram níveis de corticosterona similar àqueles que sequer sofreram cirurgia.

REFERÊNCIAS

ANNA, I.; OLSSON, A. S.; DAHLBORN, K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of environmental enrichment. **Laboratory Animals**, v. 36, n. 3, p. 243-270, 2002.

ARMARIO, A.; MONTERO, J. L.; BALASCH, J. Sensitivity of corticosterone and some metabolic variables to graded levels of low intensity stresses in adult male rats. **Physiology & Behavior**, v. 37, n. 4, p. 559-561, 1986.

BATCHELOR, G. R. The rest/activity rhythm of the laboratory rat housed under different systems. **Animal Technology**, v. 45, p. 181-187, 1994.

BAUMANS, V.; VAN DE WEERD, H. A. Enrichment of laboratory animal housing: basic need or luxury? **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 23, n. 1, p. 93-95, 1996.

BELZ, E. E. et al. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 76, n. 3/4, p. 481-486, 2003.

BESCH, E. L. Definition of Laboratory Animal Conditions. In: MOBERG, G. P. **Animal Stress**. Maryland: American Physiological Society, 1985. cap. 17, p. 297-315.

BESCH, E. L. Animal Facility Ventilation Air Quality and Quantity. **ASHRAE Transactions: Symposia**, vol. 98, suplemento 2, p. 134-157, 1992.

BOERE, V. Environmental enrichment for neotropical primatas in cativeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 543-551, 2001.

BRENT, L.; LEE, D. R.; EICHBERG, J. W. The effects of single caging on chimpanze behavior. **Laboratory Animal Science**, v. 39, n. 4, p. 345-346, 1989.

BRODERSON, J. R.; LINDSEY, R. J.; CRAWFORD, J. E. The role of environmental ammonia in respiratory mycoplasmosis of rats. **American Journal of Pathology**, v. 85, n. 1, p. 115-127, 1976.

BROWN, K. J.; GRUNBERG, N. E. Effects of housing on male and female rats: crowding stresses males but calms females. **Physiology & Behavior**, v. 58, n. 6, p. 1085-1089, 1995.

CATALANI, A. et al. Maternal corticosterone influences behavior, stress response and corticosteroid receptors in female rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 73, n. 1, p. 105-114, 2002.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. **Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación**. 2. ed. Ontario, 1998. v. 1, Disponível em: <<http://www.ccac.ca/>> Acesso em: 10 jul. 2003.

CHMIEL, D. J. JR.; NOONAN, M. Preference of laboratory rats for potentially enriching stimulus objects. **Laboratory Animals**, v. 30, n. 2, p. 97-101, 1996.

CLARK, J. D.; RAGER, D. R.; CALPIN, J. P. Animal well-being 1. General considerations. **Laboratory Animal Science**, v. 47, n. 6, p. 564-570, 1997.

CLOUGH, G. Quality in Laboratory Animals. In: TUFFERY, A. A. **Laboratory Animals: an introduction for new experimenters**. Londres: John Wiley & Sons, 1987, cap. 15, p. 79-97.

COVIELLO-MCLAUGHLIN, G. M.; STARR, S. J. Rodent enrichment devices - evaluation of preference and efficacy. **Contemporary Topics**, v. 36, n. 6, p. 66-68, 1997.

CROSS, S. E. et al. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 48, n. 4, p. 189-197, 1995.

DAHLBORN, K. et al. Evaluation of long-term environmental enrichment in the mouse. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 23, n. 1, p. 97-106, 1996.

DETILLION, C. E. et al. Social facilitation of wound healing. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, n. 8, p. 1004-1011, 2004.

DE BOER, S. F.; SLANGEN, J. L.; VAN DER GUGTEN, J. Adaptation of plasma catecholamine and corticosterone responses to short-term repeated noise stress in rats. **Physiology & Behavior**, v. 44, n. 2, p. 273-280, 1988.

EINON, D. F. et al. Isolation has permanent effects upon the behavior of the rat, but not the mouse, gerbil or guinea pig. **Developmental Psychobiology**, v. 14, n. 4, p. 343-355, 1981.

ELLISON, G. W. Cicatrização visceral e distúrbios decorrentes da reparação. In: BOJRAB, M. J. **Mecanismos da Moléstia na Cirurgia dos Pequenos Animais**. 2. ed. São Paulo: Manole Ltda, 1996. cap. 24, p. 178-183.

ESKOLA, S.; KALISTE-KORHONEN, E. Effects of cage type and gnawing blocks on weight gain, organ weights and open-field behaviour wistar rats. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 25, n. 4, p.180-193, 1998.

ESKOLA, S. et al. The use of aspen blocks and tubes to enrich the cage environment of laboratory rats. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 26, n. 1, p. 1-10, 1999.

EURIDES, D.; FARIA, M. A. R.; VITOR, J. R. Pomada de própolis no tratamento de feridas da pele de cão: estudo experimental. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 2, p. 37-40, 1985.

FILE, S. E. et al. Dissociation between behavioral and corticosterone responses on repeated exposures to cat odor. **Physiology & Behavior**, v. 54, n. 6, p. 1109-1111, 1993.

FLECKNELL, P. A. **Laboratory Animal Anesthesia**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 1996. cap. 7, p. 159- 237.

GALIANO, R. D. et al. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, n. 4, p. 485-492, 2004.

GÄRTNER, K. et al. Stress response of rats to handling and experimental procedures. **Laboratory Animals**, v. 14, n. 3, p. 267-274, 1980.

GINTHER, A. J.; ZIEGLER, T. E.; SNOWDON, C. T. Reproductive biology of captive male cottontop tamarin monkeys as a function of social environment. **Animal Behavior**, v. 61, n. 1, p. 65-78, 2001.

GOSAIN, A.; LUIZA, M. D.; DiPIETRO, M. D. Aging and wound healing. **World Journal of Surgery**, v. 28, n. 3, p. 321-326, 2004.

GUPTA, A.; MANHAS, N.; RAGHUBIR, R. Energy metabolism during cutaneous wound healing in immunocompromised and aged rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 259, n. 1/2, p. 9-14, 2004.

HAEMISCH, A.; VOSS, T.; GÄRTNER, K. Effects of environmental enrichment on aggressive behaviour, dominance hierarchies, and endocrine states in male DBA/2J mice. **Physiology & Behavior**, v. 56, n. 5, p. 1041-1048, 1994.

HARRIS, L. et al. Assessing the value of television as environmental enrichment for individually housed rhesus monkeys: A behavioral economic approach. **Contemporary Topics**, v. 38, n. 2, p. 48-53, 1999.

HEINE, W. Design for laboratory animal facilities. **Zentralblatt fur veterinarmedizin**. v. 25, n. 1, p. 189-195, 1978.

HENDERSON, N. D. Short exposures to enriched environments can increase genetic variability of behavior in mice. **Developmental Psychobiology**, v. 9, n. 6, p. 549-553, 1976.

HOBBS, B. A.; KOZUBAL, W.; NEBIAR, F. F. Evaluation of objects for environmental enrichment of mice. **Contemporary Topics**, v. 36, n. 3, p. 69-71, 1997.

HUCK, U. W.; PRINCE, E. O. Differential effects of environmental enrichment on the open-field behaviour of wild and domestic norway rats. **Journal of Comparative Physiological Psychology**, v. 89, n. 8, p. 802-808, 1975.

HUGHES, B. O.; DUNCAN, I. J. H. The notion of ethological need models of motivation and animal welfare. **Animal Behavior**, v. 36, p. 1696-1707, 1988.

INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**: animal environment, housing, and management. Washington, D. C: National Academy Press, 1996, p. 21-55.

JURASKA, J. M.; MEYER, M. Behavioral interactions of postweaning male and female rats with a complex environment. **Developmental Psychobiology**, v. 19, n. 6, p. 493-500, 1986.

KALISTE-KORHONEN, E. et al. Effects of gnawing material, group size and cage level in rack on wistar rats. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 22, n. 4, p. 291-299, 1995.

KEY, D. Environmental enrichment options for laboratory rats and mice. **Laboratory Animals**, v. 33, n. 2, p. 39-44, 2004.

KIECOLT-GLASER, J. et al. Slowing of wound healing by psychological stress. **The Lancet**, v. 346, p. 1194-1196, 1995.

KINSEY, S. G.; PRENDERGAST, B. J.; NELSON, R. J. Photoperiod and stress affect wound healing in Siberian hamsters. **Physiology & Behavior**, v. 78, n. 2, p. 205-211, 2003.

KIYONO, S. et al. Facilitative effects of maternal environmental enrichment on maze learning in rat offspring. **Physiology & Behavior**, v. 34, n. 3, p. 431-435, 1985.

KLEIN, S. L. et al. Influence of environmental and sex on predator stress response in rats. **Physiology & Behavior**, v. 56, n. 2, p. 291-297, 1994.

KROHN, T. C.; Positive and negative effects of enrichment elements in cages for small rodents. Summary of discussions from the workshop at Scanbur's seminar Oct. 1998. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 25, n. 4, p. 217-218, 1998.

LINE, S.W. et al. Effects of cage size and environmental enrichment on behavioral and physiological responses of rhesus macaques to the stress of daily events. In: NOVAK, M.A.; PETTO, A.J. **Through the looking glass: Issues of psychological well-being on captive non human primates**. Washington, DC: American Psychological Association, 1991. p. 160-179.

MANOSEVITZ, M.; MONTEMAYOR, R. J Interaction of environmental enrichment and genotype. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 79, n. 1, p. 67-76, 1972.

MANSER, C. E. **The assessment of stress in laboratory animals**. 1. ed. Londres: Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals - RSPCA, 1992. cap. 3, p. 29-54.

MANSER, C. E. et al. Investigations into the preferences of laboratory rats for nest-boxes and nesting materials. **Laboratory Animals**, v. 32, n. 1, p. 23-35, 1998.

MARTINI, L. et al. Evaluation of pain and stress levels of animals used in experimental research. **Journal of Surgical Research**, v. 88, n. 2, p. 114-119, 2000.

MERING, S.; KALISTE-KORHONEN, E.; NEVALAINEN, T. Estimates of appropriate number of rats: interaction with housing environment. **Laboratory Animals**, v.35, n. 1, p. 80-90, 2001.

MOTT, K. J.; CLARK, D. P.; STELLJES, L. S. Regional variation in wound contraction of mohs surgery defects allowed to heal by second intention. **Dermatologic Surgery**, v. 29, n. 7, p. 712-722, 2003.

NATELSON, B. H. et al. Humoral indices of stress in rats. **Physiology & Behavior**, v. 26, n. 6, p. 1049-1054, 1981.

NATELSON, B. H. et al. Adrenal hormonal indices of stress in laboratory rats. **Physiology & Behavior**, v. 39, n. 1, p. 117-125, 1987.

OTTENWELLER, J. E. et al. A chronic stress state in rats: effects of repeated stress on basal corticosterone and behavior. **Physiology & Behavior**, v. 51, n. 4, p. 689-698, 1992.

PADGETT, D. A.; MARUCHA, P. T.; SHERIDAN, J. F. Restraint stress slows cutaneous wound healing in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 12, n. 1, p. 64-73, 1998.

PATTERSON-KANE, E. G. Environmental enrichment for laboratory rats: a review. **Animal Technology**, v. 52, n. 2, p. 77-84, 2001.

PEACOCK E. E. JR.; VAN WINKLE, W. JR. Repair of skin wounds. In: _____ **Surgery and biology of wound repair**. Philadelphia: WB Saunders Company, 1970. cap.6, p. 171-239.

PENG, X. et al. Effect of cage population density on plasma corticosterone and peripheral lymphocyte populations of laboratory mice. **Laboratory Animals**, v. 23, n. 4, p. 302-306, 1989.

PÉREZ, C. et al. Individual housing influences certain biochemical parameters in the rat. **Laboratory Animals**, v. 31, n. 4, p. 357-361, 1997.

POOLE, T. **Assessing the welfare implications of environmental enrichment**. [S.l.: s.n.], 1996. p. 8-20. Cópia Xerográfica.

POOLE, T. Happy animals make good science. **Laboratory Animals**, v. 31, n. 2, p. 116-124, 1997.

RENNER, M. J.; ROSENZWEIG, M. R. Social interactions among rats housed in grouped and enriched conditions. **Developmental Psychobiology**, v. 19, n. 4, p. 303-313, 1986.

ROJAS, I. et al. Stress-induced susceptibility to bacterial infection during cutaneous wound healing. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 16, n. 1, p. 74-84, 2002.

ROY, V. et al. Environmental enrichment in BALB/c mice. Effects in classical test of anxiety and exposure to a predatory odor. **Physiology & Behavior**, v. 74, n. 3, p. 313-320, 2001.

RUSZCZAK, Z.; SCHWARTZ, R. A. Modern aspects of wound healing: an update. **Dermatologic Surgery**, v. 26, n. 3, p. 219-229, 2000.

SCHARMANN, W. Improved housing of mice, rats and guinea-pigs: a contribution to the refinement of animal experiments. **ATLA (Alternatives to Laboratory Animals)**, v. 19, p. 108-114, 1991.

SERPELL, J. A. Sheep in wolves clothing? Attitudes to animals among farmers and scientists. In: DOLLINS, F. L. **Attitudes to Animals: views in animal welfare**. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.

SHERWIN, C. M. Preferences of individually housed TO strain laboratory mice for loose substrate or tubes for sleeping. **Laboratory Animals**, v. 30, n. 3, p. 245-251, 1996.

SHERWIN, C. M. Observations on the prevalence of nest-building in non-breeding TO strain mice and their use of two nesting materials. **Laboratory Animals**, v. 31, n. 2, p. 125-132, 1997.

SLOMINSKI, A.; WORTSMAN, J. Neuroendocrinology of the skin. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 5, p. 457-487, 2000.

STEFANSKI, V. Social stress in loser rats: opposite immunological effects in submissive and subdominant males. **Physiology & Behavior**, v. 63, n. 4, p. 605-613, 1998.

STEFANSKI, V.; ENGLER, H. Social stress, dominance and blood cellular immunity. **Journal of Neuroimmunology**, v. 94, n. 1/2, p. 144-152, 1999.

STEFANSKI, V. Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. **Psychoneuroendocrinology**, v. 25, n. 4, p. 389-406, 2000.

STEWART, K. L. Environmental enrichment program development: hurdling the common obstacles. **Animal Technology and Welfare**, v. 2, n. 1, p. 9-12, 2003.

STEWART, K. L.; BAYNE, K. Environmental enrichment for laboratory animals. In: REUTER, J. D.; SUCKOW, M. A. (Eds.). **Laboratory Animal Medicine and Management**. Disponível em: < <http://www.ivis.org>>, Acesso em: 02 ago. 2004.

STRIER, K. B.; ZIEGLER, T. E. Behavioral and Endocrine Characteristics of the Reproductive Cycle in Wild Muriqui Monkeys, *Brachyteles arachnoides*. **American Journal of Primatology**, v. 42, n. 4, p. 299-310, 1997.

TSAI, P. P. et al. Impact of environmental enrichment in mice. 1: Effect of housing conditions on body weight, organ weighs and haematology in different strains. **Laboratory Animals**, v. 36, n. 4, p. 411-419, 2002.

TSAI, P. P. et al. Are the effects of different enrichment designs on the physiology and behaviour of DBA/2 mice consistent? **Laboratory Animals**, v. 37, n. 4, p. 314-327, 2003.

VAN DE WEERD, H. A. et al. Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. **Laboratory Animals**, v. 31, n. 2, p. 133-143, 1997.

VAN DE WEERD, H. A. et al. Strength of preference for nesting material as environment enrichmental for laboratory mice. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 55, n. 3/4, p. 369-382, 1998.

VAN LOO, P. L. P.; VAN DE WEERD, H. A.; BAUMANS, V. Short and long term influence of an easy applicable enrichment device on the behaviour of the laboratory mouse. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 23, n. 1, p. 113-118, 1996.

VAN LOO, P. L. P. et al. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. **Laboratory Animals**, v. 38, n. 2, p. 178-188, 2004.

VIEIRA, S. C. et al. Efeito cicatrizante da pomada de persea cordata mez. (lauraceae) em feridas cutâneas de cobaias. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 3, n. 2, p. 31-35, 2001.

VISALBERGHI, E.; FRAGASZY, D. The behaviour of capuchin monkeys *Cebus apella* with novel food: the role of social context. **Animal Behavior**, v. 49, n. 4, p. 1089-1095, 1995.

WEIHE, W. H. The effects on animals of change in ambient temperature and humidity. IN: McSEEHY, T. **Laboratory Animal Handbooks**. Londres: Laboratory Animals, 1976. p. 41-50.

WIDMAN, D. R.; ROSELLINI, R. A. Restricted daily exposure to environmental enrichment increases the diversity of exploration. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 1, p. 57-62, 1990.

WOODCOCK, E. A.; RICHARDSON, R. Effects of environmental enrichment on rate of contextual processing and discriminative ability in adult rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 73, n. 2, p. 1-10, 2000.