

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 13/11/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO ADMINISTRADO POR
VIA ENTERAL E PARENTERAL EM RETALHOS CUTÂNEOS
ISQUÊMICOS INDUZIDOS EM RATOS

MARINA FRAZATTI GALLINA

Botucatu – SP

Maio de 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO ADMINISTRADO POR
VIA ENTERAL E PARENTERAL EM RETALHOS CUTÂNEOS
ISQUÊMICOS INDUZIDOS EM RATOS

MARINA FRAZATTI GALLINA

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia Animal para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Felismino Charas dos Santos

Co-orientador: Prof. Titular Carlos Alberto Hussni

Botucatu – SP

Maio de 2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Gallina, Marina Frazatti.

Avaliação do ácido hialurônico administrado por via enteral e parenteral em retalhos cutâneos isquêmicos induzidos em ratos / Marina Frazatti Gallina. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ivan Felismino Charas dos Santos

Coorientador: Carlos Alberto Hussni

Capes: 50501003

1. Ácido hialurônico. 2. Procedimentos cirúrgicos reconstrutivos. 3. Cicatrização. 4. Interleucinas.

Palavras-chave: Cicatrização; Cirurgia reconstrutiva; Hialuronato de sódio; Interleucinas inflamatórias.

Nome do autor: Marina Frazatti Gallina

Título: Avaliação do ácido hialurônico administrado por via enteral e parenteral em retalhos cutâneos isquêmicos induzidos em ratos.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Ivan Felismino Charas dos Santos
Orientador
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dra. Vívian Ferreira Zadra
Membro
Departamento de Veterinária e Produção Animal
Centro de Ciências Agrárias (CCA)
Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP)
Campus de Bandeirantes, Paraná

Profa. Dra. Geysa Almeida Viana
Membro
Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Federal de Rondônia - UNIR
Campus de Rolim de Moura

Data da defesa: 13 de maio de 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Botucatu, em especial à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) e o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal pela oportunidade de cursar o Mestrado, pela estrutura e suporte oferecidos.

À Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado.

À Bloomage Freda Biopharm Company e à Tovani Benzaquen Ingredientes, por disponibilizarem o ácido hialurônico utilizado no estudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ivan Felismino Charas dos Santos, pela grande oportunidade que me foi concedida. Obrigada por me inserir neste universo da pesquisa científica, pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade e auxílio durante o período do Mestrado; e ao meu co-orientador Prof. Titular Carlos Alberto Hussni pela colaboração no desenvolvimento do projeto de pesquisa.

À Profa. Associada Claudia Helena Pellizzon do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências (IBB), UNESP, Botucatu, pelos ensinamentos, disponibilidade, e por conceder a estrutura para a execução do projeto, em tempos conturbados de pandemia, a sua colaboração foi essencial. Ao Dr. Lucas Fernando Sérgio Gushiken do Laboratório Experimental de Produtos Naturais, Departamento de Morfologia (IBB, UNESP, Botucatu) pela ajuda durante o projeto e pelas análises das interleucinas inflamatórias.

Agradeço à Profa. Dra. Miriam Harumi Tsunemi, Departamento de Bioestatística (IBB, UNESP, Botucatu) pela realização das análises estatística do estudo.

Aos que me ajudaram na execução do projeto, em especial a minha colega de pós-graduação a doutoranda Bruna Martins da Silva pelo auxílio prático e pelo apoio durante o projeto e ao aluno de iniciação científica Guilherme Cirino Coelho Pereira, sou extremamente grata a vocês pela ajuda e pelo trabalho executado com seriedade, profissionalismo e dedicação. Agradeço, também, à aluna de graduação Karina Calixto de Almeida e aos demais alunos de iniciação científica que contribuíram de alguma forma no projeto.

Aos animais que participaram do estudo, por todo aprendizado, contribuição com a Ciência, melhoria de vida de outros animais e da Humanidade.

Agradeço a Deus pela grande oportunidade profissional e de vida concedida no período do Mestrado, por colocar as pessoas certas no meu caminho, pela minha saúde e dos meus familiares, e poder estar bem nesse período conturbado que a Humanidade enfrenta.

À minha mãe Neuza Maria Frazatti Gallina e ao meu irmão Daniel Frazatti Gallina, por todo apoio, carinho e por serem os meus maiores incentivadores na vida, agradeço por estarem na minha vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

	Páginas
CAPÍTULO 1	3
1. Introdução e Justificativa.....	4
2. Revisão de Literatura	6
2.1. Cicatrização	6
2.2. Retalhos cutâneos.....	6
2.3. Ácido hialurônico	7
2.3.1. Ácido hialurônico exógeno.....	8
2.4. Biomarcadores inflamatórios.....	10
3. Referências.....	12
CAPÍTULO 2	18
Trabalho Científico.....	19
ANEXOS	48
Anexo 1.....	49

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1. Mediana (Med) e amplitude [mínima (min) e máxima (max)] da massa corpórea (g) de ratos Wistar submetidos à confecção de retalhos cutâneos isquêmicos e tratados com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1), água destilada por via enteral (G2), AH (0,3%) por via parenteral (G3), e AH (1%) por via enteral (G4), e avaliados 10 minutos antes da confecção dos retalhos cutâneos (M0), terceiro dia (M3d) e no sétimo dia (M7d) após a confecção dos retalhos.....29

Tabela 2. Mediana (Med) e amplitude [mínima (min) e máxima (max)] dos valores da temperatura retal (° C) de ratos Wistar submetidos à confecção de retalhos cutâneos isquêmicos e tratados com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1), água destilada por via enteral (G2), AH (0,3%) por via parenteral (G3), e AH (1%) por via enteral (G4), e avaliados 10 minutos antes da confecção dos retalhos cutâneos (M0), terceiro dia (M3d) e no sétimo dia (M7d) após a confecção dos retalhos.....29

Tabela 3. Mediana (Med) e amplitude [mínima (min) e máxima (max)] do percentual de necrose (%) de ratos Wistar submetidos à confecção de retalhos cutâneos isquêmicos e tratados com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1), água destilada por via enteral (G2), AH (0,3%) por via parenteral (G3), e AH (1%) por via enteral (G4), avaliados no terceiro dia (M3d) e sétimo dia (M7d) após a confecção dos retalhos.....30

Tabela 4. Mediana (Med) e amplitude [mínima (min) e máxima (max)] do valor da interleucinas IL-1 β (pg/mg de proteína) e IL-6 (pg/mg de proteína) e do FNT α (pg/mg de proteína) dos retalhos cutâneos isquêmicos tratados com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1), água destilada por via enteral (G2), AH (0,3%) por via parenteral (G3), e AH (1%) por via enteral (G4), e avaliados no terceiro dia (M3d) e no sétimo dia (M7d) após a confecção dos retalhos.....31

Tabela 5. Mediana (Med) e amplitude [mínima (min) e máxima (max)] do valor de interleucina IL-10 (pg/mg de proteína) dos retalhos cutâneos isquêmicos tratados com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1), água destilada por via enteral (G2), AH (0,3%) por via parenteral (G3), e AH (1%) por via enteral (G4), e avaliados no terceiro dia (M3d) e no sétimo dia (M7d) após a confecção dos retalhos.....32

Tabela 6. Mediana (Med) e amplitude [mínima (min) e máxima (max)] da espessura da epiderme (μm), da quantidade de vasos sanguíneos (μm^2), do número de células inflamatórias totais (μm^2) e colágeno total (μm^2) de ratos Wistar submetidos à confecção de retalhos cutâneos isquêmicos e tratados com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1), água destilada por via enteral (G2), AH (0,3%) por via parenteral (G3), e AH (1%) por via enteral (G4), e avaliados no terceiro dia (M3d) e no sétimo dia (M7d) após a confecção dos retalhos.....33

LISTA DAS FIGURAS

- Figura 1.** A - Demarcação do retalho cutâneo; B - Elevação do retalho cutâneo com a inclusão do músculo panniculus carnosus; C - Aspecto final do retalho cutâneo dorsal após a dermorrafia (Arquivo pessoal, 2021).....22
- Figura 2.** Aspecto macroscópico da necrose dos retalhos cutâneos dorsais isquêmicos tratados com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1), água destilada por via enteral (G2), AH (0,3%) por via parenteral (G3), e AH (1%) por via enteral (G4), e avaliados no terceiro dia (M3d) e no sétimo dia (M7d) após a confecção dos retalhos.....30
- Figura 3.** Fotomicrografias da mensuração da espessura da epiderme (demarcação vermelha) dos retalhos isquêmicos tratados com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1), água destilada por via enteral (G2), AH (0,3%) por via parenteral (G3), e AH (1%) por via enteral (G4), avaliados no terceiro dia (M3d) e sétimo dia (M7d) após a confecção dos retalhos. (H&E, 40x, barra de escala 20 µm).....34
- Figura 4.** Fotomicrografias da região da derme profunda dos retalhos isquêmicos tratados com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1), água destilada por via enteral (G2), AH (0,3%) por via parenteral (G3), AH (1%) por via enteral (G4), avaliados no terceiro dia (M3d) e sétimo dia (M7d) após confecção dos retalhos, ilustrando vasos sanguíneos (setas pretas) e células inflamatórias (H&E, 40x, barra de escala 20 µm).....35
- Figura 5.** Fotomicrografias da região dérmica dos retalhos isquêmicos tratados com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1), água destilada por via enteral (G2), AH (0,3%) por via parenteral (G3), e AH (1%) por via enteral (G4), avaliados no terceiro dia (M3d) e sétimo dia (M7d) após a confecção dos retalhos, ilustrando as fibras colágenas coradas em verde (Tricômio de Masson, 40x, barra de escala 20 µm).....36

GALLINA, M. F. Avaliação do ácido hialurônico administrado por via enteral e parenteral em retalhos cutâneos isquêmicos induzidos em ratos. Botucatu, 2022. 58p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal – Área de Clínica Cirúrgica Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

RESUMO

O ácido hialurônico (AH) é um polímero natural com propriedades imunomoduladora, antioxidante e anti-inflamatória, e usado no tratamento de feridas. Visto que para que ocorra a viabilidade do retalho cutâneo deve existir a estimulação da neovasculogênese e inibição da inflamação exacerbada, o presente estudo teve por objetivo avaliar o AH exógeno por via enteral e parenteral em retalhos cutâneos isquêmicos induzidos em ratos, por meio de exames clínicos, histológicos e avaliação dos biomarcadores pró e anti-inflamatórios teciduais. Sessenta e quatro ratos com retalhos cutâneos isquêmicos no dorso foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de 16 animais, de acordo com o tratamento: solução salina (0,9%) por via subcutânea (SC); água destilada por via oral (VO); AH (0,3%) (SC); AH (1%) (VO). As variáveis avaliadas incluíram a avaliação clínica e macroscópica, exame histológico e a avaliação das interleucinas pró e anti-inflamatórias. Para tal, oito ratos de cada grupo foram eutanasiados no terceiro e sétimo dia após a confecção dos retalhos. Foi identificado menor percentual de necrose nos ratos tratados com o AH parenteral. Observou-se variações significativas com relação as interleucinas pró e anti-inflamatórias, espessura da epiderme, quantidade total vasos sanguíneos e células inflamatórias intragrupos e intergrupos. O AH em forma de hialuronato de sódio de alto peso molecular (1400 ~ 2000 kDa) demonstrou efeitos benéficos quando usado por via enteral e parenteral em retalhos cutâneos isquêmicos de ratos. O AH (0,3%) administrado por via parenteral no local do retalho logo após seu fechamento evidenciou melhores resultados no percentual de necrose e no processo de epitelização.

Palavras-chave: cicatrização; cirurgia reconstrutiva; interleucinas inflamatórias; hialuronato de sódio.

GALLINA, M. F. Evaluation of hyaluronic acid administered by enteral and parenteral route in ischemic skin flaps induced in rats. Botucatu, 2022. 58p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal – Área de Clínica Cirúrgica Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

ABSTRACT

Hyaluronic acid (HA) is a natural polymer with immunomodulatory, antioxidant and anti-inflammatory properties, and used in the treatment of wounds. Since, for the viability of the skin flap, there must be stimulation of neovasculogenesis and inhibition of exacerbated inflammation, the present study aimed to evaluate exogenous HA enteral and parenterally in ischemic skin flaps induced in rats, through clinical examinations, histological and evaluation of pro and anti-inflammatory biomarkers tissue. Sixty-four rats with ischemic skin flaps on the back were randomly divided into four groups of 16 animals, according to treatment: saline solution (0.9%) subcutaneously (SC); orally distilled water (PO); AH (0.3%) (SC); AH (1%) (VO). The variables evaluated included clinical and macroscopic evaluation, histological examination and the evaluation of pro- and anti-inflammatory interleukins. Eight rats from each group were euthanized on the third and seventh day after making the flaps. A lower percentage of necrosis was identified in rats treated with parenteral HA. Significant variations were observed in relation to pro and anti-inflammatory interleukins, epidermis thickness, total amount of blood vessels and intragroup and intergroup inflammatory cells. HA in the form of high molecular weight sodium hyaluronate (1400 ~ 2000 kDa) has demonstrated beneficial effects when used enterally and parenterally in ischemic skin flaps in rats. HA (0.3%) administered parenterally at the flap site after its closure showed better results of the percentage of necrosis and epithelialization.

Keywords: healing; reconstructive surgery; inflammatory cytokines; sodium hyaluronate.

3 REFERÊNCIAS

ABATANGELO, G.; VINDIGNI, V.; AVRUSCIO, G.; PANDIS, L.; BRUN, P. Hyaluronic Acid: Redefining Its Role. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1743, 2020.

AIN, Q. U.; SARFRAZ, M.; PRASESTI, G. K.; DEWI, T. I.; KURNIATI, N. F. Confounders in identification and analysis of inflammatory biomarkers in cardiovascular diseases. **Biomolecules**, v. 9, n. 10, p.1464, 2021.

ALMEIDA, K. G.; FAGUNDES, D. J.; MANNA, M. C. B.; MONTERO, E. F. S. Ação do dimetil-sulfóxido na isquemia de retalhos randômicos de pele em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, n. 6, p. 649 - 657, 2004.

AYA, K. L.; STERN, R. Hyaluronan in wound healing: rediscovering a major player. **Wound Repair and Regeneration**, v. 22, n. 5, p. 579 - 93, 2014.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27 - 51, 2005.

BALOGH, L.; POLYAK, A.; MATHE, D.; KIRALY, R.; THUROCZY, J.; TEREZ, M.; JANOKI, G.; TING, Y.; BUCCI, L. R.; SCHAUSS, A. G. Absorption, uptake and tissue affinity of high-molecular-weight hyaluronan after oral administration in rats and dogs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 22, p. 10582–10593, 2008.

BESERRA, F. P.; GUSHIKEN, L. F. S; VIEIRA, A. J., BÉRGAMO D. A.; BÉRGAMO P. L.; SOUZA M. O.; HUSSNI C. A.; TAKAHIRA R. K.; NÓBREGA R. H.; MARTINEZ E. R. M.; JACKSON C. J.; MAIA G. L. A.; ROZZA A. L.; PELLIZZON, C. H. From inflammation to cutaneous repair: topical application of lupeol improves skin wound healing in rats by modulating the cytokine levels, NF- κ B, Ki-67, growth factor expression, and distribution of collagen fibers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p.4952, 2020.

BOERIU, C. G.; SPRINGER, J.; KOOY, F. K.; VAN DEN BROEK, L. A. M.; EGGINK, G. Production methods for hyaluronan. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2013, p.1-14, 2013. 2013.

CAMPOS, E. B. P.; YOSHIDA, W. B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 4, p. 357 - 366, 2004.

CHEN, R. F.; WANG, C. T.; CHEN, Y. H.; CHIEN, C. M.; LIN, S. D.; LAI, C. S.; WANG, C. J.; KUO, Y. R. Hyaluronic acid-povidone-iodine compound facilitates diabetic wound healing in a streptozotocin-induced diabetes rodent model. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 143, n. 5, p. 1371 - 1382, 2019.

CUDDY, L. C. Wound closure, tension-relieving techniques, and local flaps. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.47 n.6 p.1221-1235, 2017.

CYMROT, M.; PERCÁRIO, S.; FERREIRA, L. M. Comportamento do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante total em ratos submetidos a retalhos cutâneos isquêmicos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 18 - 26, 2004.

De OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; Salomão, R. Interleucinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503 -508, 2000.

ESTEVES, I. J.; MASSON, I. B.; FERREIRA, L. M.; LIEBANO, R. E.; BALDAN, C.; GOMES, A. C. Administração tópica de cloridrato de hidralazina na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 164 - 167, 2005.

FALLACARA, A.; BALDINI, E.; MANFREDINI, S.; VERTUANI, S. Hyaluronic acid in the third millennium. **Polymers**, v. 10, n. 7, p. 701, 2018.

FENG, X.; CHEN, Y.; ZHANG, M.; FANG, M.; XIAO, C.; CHEN, J. Protective effect of citicoline on random flap survival in a rat mode. **International Immunopharmacology**, v. 83, p. 106448, 2020.

GRANGER, D. N.; KVIETYS, P.R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept. **Redox Biology**, v. 6, p. 524 – 551, 2015.

HANNA, A.; FRANGOIANNIS N. G. Inflammatory cytokines and chemokines as therapeutic targets in heart failure. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 34, n. 6, p. 849 -863, 2020.

HEDLUND, C. S. Cirurgia do Sistema Tegumentar. *In*: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 192 - 224.

HONRADO, C. P.; MURAKAMI, C. S. Wound healing and physiology of skin flaps. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 13, n. 2, p. 203 -214, 2005.

HOSGOOD, G. Stages of Wound Healing and Their Clinical Relevance. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 36, n. 4, p. 667–685, 2006.

HUANG, G.; LIN, Y.; FANG, M.; LIN, D. Protective effects of icariin on dorsal random skin flap survival: an experimental study. **European Journal of Pharmacology**, v. 861, p.172600, 2019.

HUMBERT, P.; MIKOSINKI, J.; BENCHIKHI, H.; ALLAERT, F. A. Efficacy and safety of a gauze pad containing hyaluronic acid in treatment of leg ulcers of venous or mixed origin: a double-blind, randomised, controlled trial. **International Wound Journal**, v. 10, n. 2, p. 159- 166, 2013.

IACOPETTI, I.; PERAZZI, A.; MARTINELLO, T.; GEMIGNANI, F.; PATRUNO M. Hyaluronic acid, Manuka honey and Acemannan gel: wound-specific applications for skin lesions. **Research in Veterinary Science**, v. 129, p. 82–89, 2020.

ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; REGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 3/4, p. 125, 2010.

KAUL, A.; SHORT, W. D.; KESWANI, S. G.; WANG, X. Immunologic roles of hyaluronan in dermal wound healing. **Biomolecules**, v. 11, n. 8, 2021.

KAWADA, C.; KIMURA, M.; MASUDA, Y.; NOMURA Y. Oral administration of hyaluronan prevents skin dryness and epidermal thickening in ultraviolet irradiated hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 153, p. 215–221, 2015.

KIMURA, M.; MAESHIMA, T.; KUBOTA, T.; KURIHARA, H.; MASUDA, Y.; NOMURA, Y. Absorption of Orally Administered Hyaluronan. **Journal of Medicinal Food**, v. 19, n. 12, p. 1172 - 1179, 2016.

KIRPENSTEIJN, J.; HAAR, G. T. **Reconstructive surgery and wound management of dog e cat**. London: Manson Publishing Ltda, 2013.

LAW, C. H.; LI, J. M.; CHOU, H. C.; CHEN, Y. H.; CHAN, H. L. Hyaluronic acid-dependent protection in H9C2 cardiomyocytes: A cell model of heart ischemia-reperfusion injury and treatment. **Toxicology**, v. 303, p. 54 - 71, 2013.

LEE, M.; HAN, S. H.; CHOI, W. J.; CHUNG, K. H.; LEE, J. W. Hyaluronic acid dressing (Healoderm) in the treatment of diabetic foot ulcer: a prospective, randomized, placebo-controlled, single-center study. **Wound Repair and Regeneration**, v. 24, n. 3, p. 581 - 588, 2016.

LEITE, M. N.; FRADE, M. A. C. Efficacy of 0.2% hyaluronic acid in the healing of skin abrasions in rats. **Heliyon**, v. 7, n. 7, p. 07572, 2021.

LIANG, S.; WANG, Y.; LIU, Y. Dexmedetomidine alleviates lung ischemia-reperfusion injury in rats by activating PI3K/Akt pathway. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 1, p. 370 - 377, 2019.

LITWINIUK, M.; KREJNER, A.; SPEYER, M. S.; GAUTO, A. R.; GRZELA, T. Hyaluronic acid in inflammation a tissue regeneration. **Wounds**, v. 28, n. 3, p. 78 - 88, 2016.

MAYTIN, E. V. Hyaluronan: more than just a wrinkle filler. **Glycobiology**, v. 26, n. 6, p. 553 - 559, 2016.

MOLNAR, A.; MAGYAR, Z.; NACHMIAS, D. B.; MANN, D.; SZABO, B.; TOTH, L.; NEMETH, N.. Effect of short-term ischemia on microcirculation and wound healing of adipocutaneous flaps in the rat. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 34, n. 12, p. 201901203, 2019.

OE, M.; MITSUGI, K.; ODANAKA, W.; YOSHIDA, H.; MATSUOKA, R.; SEINO, S.; KANEMITSU, T.; MASUDA, Y. Dietary hyaluronic acid migrates into the skin of rats. **Scientific World Journal**, v. 2014, e378024, 2014.

PAULOIN, T.; DUTOT, M.; WARNET, J. M.; RAT, P. In vitro modulation of preservative toxicity: high molecular weight hyaluronan decreases apoptosis and oxidative stress induced by benzalkonium chloride. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 4-5, p. 263 - 73, 2008.

PAVLETIC, M. M. **Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery**. 4 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2018.

PEDRETTI, S. L.; RENA, C. L.; CASTÃNAN, M. C. M. N.; DUQUE, A. P. N.; PEREIRA, F. H.; NUNES, T. A. Efeitos do dimetilsulfóxido e da pentoxifilina na vitalidade de retalhos cutâneos em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 44, n. 5, p. 457- 464, 2017.

RODNEY, T.; OSIER, N.; GILL, J. Pro- and anti-inflammatory biomarkers and traumatic brain injury outcomes: a review. **Cytokine**, v. 110, p. 248 - 256, 2018.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 170–181, 2010.

SHALOM, A.; HADAD, E.; FRIEDMAN, T.; KREMER, E.; WESTREICH, M. Effect of hyaluronic acid on random-pattern flaps in rats. **Dermatologic Surgery**, v. 34, n. 9, p. 1212 - 1215, 2008.

SILVA, J. J.; POMPEU, D. G.; XIMENES, N. C.; DUARTE, A. S.; GRAMOSA, N. V.; CARVALHO, K. M.; BRITO, G. A.; GUIMARÃES, S. B. Effects of kaurenoic acid and arginine on random skin flap oxidative stress, inflammation, and cytokines in rats. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 39, n. 6, p. 971 - 977, 2015.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 6, n. 10, a016295, 2014.

UCHIYAMA, A.; YAMADA, K.; PERERA, B.; OGINO, S.; YOKOYAMA, Y.; TAKEUCHI, Y.; ISHIKAWA, O.; MOTEGI, S. I. Protective effect of mfg-e8 after cutaneous ischemia-reperfusion injury. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 4, p. 1157 - 1165, 2015.

VOIGT, J.; DRIVER, V. R. Hyaluronic acid derivatives and their healing effect on burns, epithelial surgical wounds, and chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Wound Repair and Regeneration**, v. 20, n. 3, p. 317- 331, 2012.

ZHONG, J.; DENG, Y.; TIAN, B.; WANG, B.; SUN, Y.; HUANG, H.; CHEN, L.; LING, S.; YUAN, J. Hyaluronate acid-dependent protection and enhanced corneal wound healing against oxidative damage in corneal epithelial cells. **Journal of Ophthalmology**, v. 2016, 6538051, 2016.

Referências

1. Huang G, Lin Y, Fang M, Lin D. Protective effects of icariin on dorsal random skin flap survival: an experimental study. *Eur J Pharmacol.* 2019; 861:172600. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172600.
2. Mao X, Liu L, Cheng L, Cheng R, Zhang L, Deng L, Sun X, Zhang Y, Sarmiento B, Cui W. Adhesive nanoparticles with inflammation regulation for promoting skin flap regeneration. *J Control Release.* 2019; 297:91-101. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.01.031.
3. Feng X, Chen Y, Zhang M, Fang M, Xiao C, Chen J. Protective effect of citicoline on random flap survival in a rat mode. *Int Immunopharmacol.* 2020; 83:106448. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106448.
4. Cuddy LC. Wound closure, tension-relieving techniques, and local flaps. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2017; 47(6):1221-1235. doi: 10.1016/j.cvsm.2017.06.007.
5. Pedretti SLC, Rena CL, Castãnon MCMN, Duque APN, Pereira FH, Nunes TA. Efeito do dimetilsulfóxido e da pentoxifilina na vitalidade dos retalhos cutâneos em ratos. *Rev Col Bras Cir.* 2017;44(5):457-64. doi:10.1590/0100-699120170 05006.
6. Humbert P, Mikosinki J, Benchikhi H, Allaert FA. Efficacy and safety of a gauze pad containing hyaluronic acid in treatment of leg ulcers of venous or mixed origin: a double-blind, randomised, controlled trial. *Int Wound J.* 2013;10(2):159-66. doi: 10.1111/j.1742-481X.2012.00957.x.

7. Lee M, Han SH, Choi WJ, Chung KH, Lee JW. Hyaluronic acid dressing (Healoderm) in the treatment of diabetic foot ulcer: A prospective, randomized, placebo-controlled, single-center study. *Wound Repair Regen.* 2016;24(3):581-8. doi: 10.1111/wrr.12428.
8. Litwiniuk M, Krejner A, Speyrer MS, Gauto AR, Grzela T. Hyaluronic Acid in inflammation and tissue regeneration. *Wounds.* 2016;28(3):78-88.
9. Maytin EV. Hyaluronan: More than just a wrinkle filler. *Glycobiology.* 2016;26(6):553-9. doi: 10.1093/glycob/cww033.
10. Zhong J, Deng Y, Tian B, Wang B, Sun Y, Huang H, Chen L, Ling S, Yuan J. Hyaluronate acid-dependent protection and enhanced corneal wound healing against oxidative damage in corneal epithelial cells. *J Ophthalmol.* 2016;2016:6538051. doi: 10.1155/2016/6538051.
11. Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers.* 2018;10(7):701. doi: 10.3390/polym10070701.
12. Iacopetti I, Perazzi A, Martinello T, Gemignani F, Patruno M. Hyaluronic acid, Manuka honey and Acemannan gel: Wound-specific applications for skin lesions. *Res Vet Sci.* 2020;129:82-89. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.01.009.
13. Abatangelo G, Vindigni V, Avruscio G, Pandis L, Brun P. Hyaluronic acid: redefining its role. *Cells.* 2020;9(7):1743. doi: 10.3390/cells9071743.
14. Kaul A, Short WD, Keswani SG, Wang X. Immunologic roles of hyaluronan in dermal wound healing. *Biomolecules.* 2021;11(8):1234. doi: 10.3390/biom11081234.

15. Leite MN, Frade MAC. Efficacy of 0.2% hyaluronic acid in the healing of skin abrasions in rats. *Heliyon*. 2021;7(7):e07572. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07572.
16. Balogh L, Polyak A, Mathe D, Kiraly R, Thuroczy J, Terez M, Janoki G, Ting Y, Bucci LR, Schauss AG. Absorption, uptake and tissue affinity of high-molecular-weight hyaluronan after oral administration in rats and dogs. *J Agric Food Chem*. 2008;56(22):10582-93. doi: 10.1021/jf8017029.
17. Oe M, Mitsugi K, Odanaka W, Yoshida H, Matsuoka R, Seino S, Kanemitsu T, Masuda Y. Dietary hyaluronic acid migrates into the skin of rats. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:378024. doi: 10.1155/2014/378024.
18. Kawada C, Kimura M, Masuda Y, Nomura Y. Oral administration of hyaluronan prevents skin dryness and epidermal thickening in ultraviolet irradiated hairless mice. *J Photochem Photobiol B*. 2015;153:215-21. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.09.020.
19. Kimura M, Maeshima T, Kubota T, Kurihara H, Masuda Y, Nomura Y. Absorption of orally administered hyaluronan. *J Med Food*. 2016;19(12):1172-1179. doi: 10.1089/jmf.2016.3725.
20. de Souza AB, Chaud MV, Santana MHA. Hyaluronic acid behavior in oral administration and perspectives for nanotechnology-based formulations: a review. *Carbohydr Polym*. 2019;222:115001. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115001.
21. Lima AL, Junqueira BMI, Lima LMA, Motta PG, Valadão AF, Maia MC, Soares JM. Parasitological evaluation and the effectiveness of a vermifugal protocol in bioteral carried rats. *Rev UNINGÁ*. 2019;56(2):100-108.

22. Camargo CP, Margarido NF, Guandelini E, Vieira GA, Jacomo AL, Gemperli R. Description of a new experimental model skin flap for studying skin viability in rats. *Acta Cir Bras.* 2014;29(3):166-70. doi: 10.1590/S0102-86502014000300004.
23. Silva JJ, Pompeu DG, Ximenes NC, Duarte AS, Gramosa NV, Carvalho Kde M, Brito GA, Guimarães SB. Effects of kaurenoic acid and arginine on random skin flap oxidative stress, inflammation, and cytokines in rats. *Aesthetic Plast Surg.* 2015;39(6):971-7. doi: 10.1007/s00266-015-0559-8.
24. Liu B, Xu Q, Wang J, Lin J, Pei Y, Cui Y, Wang G, Zhu L. Recombinant human growth hormone treatment of mice suppresses inflammation and apoptosis caused by skin flap ischemia-reperfusion injury. *J Cell Biochem.* 2019;120(10):18162-18171. doi: 10.1002/jcb.29122.
25. Voigt J, Driver VR. Hyaluronic acid derivatives and their healing effect on burns, epithelial surgical wounds, and chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Wound Repair Regen.* 2012;20(3):317-31. doi: 10.1111/j.1524-475X.2012.00777.x.
26. Li JM, Chou HC, Wang SH, Wu CL, Chen YW, Lin ST, Chen YH, Chan HL. Hyaluronic acid-dependent protection against UVB-damaged human corneal cells. *Environ Mol Mutagen.* 2013;54(6):429-49. doi: 10.1002/em.21794.
27. Neuman MG, Nanau RM, Oruña-Sanchez L, Coto G. Hyaluronic acid and wound healing. *J Pharm Pharm Sci.* 2015;18(1):53-60. doi: 10.18433/j3k89d.
28. Chen RF, Wang CT, Chen YH, Chien CM, Lin SD, Lai CS, Wang CJ, Kuo YR. Hyaluronic acid-povidone-iodine compound facilitates diabetic wound healing in a streptozotocin-induced diabetes rodent model. *Plast Reconstr Surg.* 2019;143(5):1371-1382. doi: 10.1097/PRS.0000000000005504.

29. Nyman E, Henricson J, Ghafouri B, Anderson CD, Kratz G. Hyaluronic acid accelerates re-epithelialization and alters protein expression in a human wound model. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2019;7(5):e2221. doi:10.1097/GOX.0000000000002221.
30. mcFarlane RM, Deyoung G, Henry RA. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plast Reconstr Surg*. 1965;35:177-82. doi: 10.1097/00006534-196502000-00007.
31. Almeida KG, Fagundes DJ, Manna MCB, Montero EFS. Ação do dimetil-sulfóxido na isquemia de retalhos randômicos de pele em ratos. *Acta Cir Bras*. 2004;19(6):649- 657. doi: 10.1590/S0102-86502004000600012.
32. Krkl C, Yiğit MV, Özercan İH, Aygen E, Gültürk B, Artaş G. The effect of ozonated olive oil on neovascularization in an experimental skin flap model. *Adv Skin Wound Care*. 2016;29(7):322-7. doi: 10.1097/01.ASW.0000484172.04260.46.
33. He JB, Fang MJ, Ma XY, Li WJ, Lin DS. Angiogenic and anti-inflammatory properties of azadirachtin A improve random skin flap survival in rats. *Exp Biol Med*. 2020;245(18):1672-1682. doi: 10.1177/1535370220951896.
34. Law CH, Li JM, Chou HC, Chen YH, Chan HL. Hyaluronic acid-dependent protection in H9C2 cardiomyocytes: a cell model of heart ischemia-reperfusion injury and treatment. *Toxicology*. 2013;303:54-71. doi: 10.1016/j.tox.2012.11.006.
35. Shalom A, Hadad E, Friedman T, Kremer E, Westreich M. Effect of hyaluronic acid on random-pattern flaps in rats. *Dermatol Surg*. 2008;34(9):1212-5. doi: 10.1111/j.1524-4725.2008.34260.x.
36. Ma J, Granton PV, Holdsworth DW, Turley EA. Oral administration of hyaluronan reduces bone turnover in ovariectomized rats. *J Agric Food Chem*. 2013;61(2):339-45. doi: 10.1021/jf300651d.

37. Roth J, Rummel C, Barth SW, Gerstberger R, Hübschle T. Molecular aspects of fever and hyperthermia. *Neurol Clin.* 2006;24(3):421-39. doi: 10.1016/j.ncl.2006.03.004.
38. Finnerty CC, Mabvuure NT, Ali A, Kozar RA, Herndon DN. The surgically induced stress response. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2013;37(5 Suppl):21S-9S. doi: 10.1177/0148607113496117.
39. Lapchik VBV, Mattaraia VGM, KO GM. Cuidados e manejo de animais de laboratório. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2017.
40. Cymrot M, Percário S, Ferreira LM. Comportamento do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante total em ratos submetidos a retalhos cutâneos isquêmicos. *Acta Cir Bras.* 2004;19(1):18 - 26.
41. Kirpensteijn J, Haar GT. Reconstructive surgery and wound management of dog e cat. London: Manson Publishing Ltda, 2013.
42. Pavletic MM. Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery. 4 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2018.
43. Aya KL, Stern R. Hyaluronan in wound healing: rediscovering a major player. *Wound Repair Reg.* 2014;22(5):579 - 93. doi: 10.1111/wrr.12214.
44. Honrado CP, Murakami CS. Wound healing and physiology of skin flaps. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2005;13(2):203-14. doi: 10.1016/j.fsc.2004.11.007.
45. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):170-81. doi: 10.1038/nri2711.

46. de Oliveira CM, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Cytokines and pain. *Rev Bras Anesthesiol.* 2011;61(2):255-9, 260-5, 137-42. doi: 10.1016/S0034-7094(11)70029-0.
47. Nosenko MA, Ambaryan SG, Drutskaya MS. Proinflammatory cytokines and skin wound healing in mice. *Mol Biol.* 2019;53(5):741-754. doi: 10.1134/S0026898419050136.
48. Pereira Beserra F, Sérgio Gushiken LF, Vieira AJ, Augusto Bérqamo D, Luísa Bérqamo P, Oliveira de Souza M, Alberto Hussni C, Kiomi Takahira R, Henrique Nóbrega R, Monteiro Martinez ER, John Jackson C, Lemos de Azevedo Maia G, Leite Rozza A, Helena Pellizzon C. From Inflammation to cutaneous repair: topical application of lupeol improves skin wound healing in rats by modulating the cytokine levels, NF- κ B, Ki-67, growth factor expression, and distribution of collagen fibers. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14):4952. doi: 10.3390/ijms21144952.
49. Campos EBP, Yoshida WB. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. *Jor Vasc Bras.* 2004;3(4):357 - 366.
50. Vinshtok Y, Cassuto D. Biochemical and physical actions of hyaluronic acid delivered by intradermal jet injection route. *J Cosmet Dermatol.* 2020;19(10):2505-2512. doi: 10.1111/jocd.13674.
51. Cui Y, Wang F, Voorhees JJ, Fisher GJ. Rejuvenation of Aged Human Skin by Injection of cross-linked Hyaluronic Acid. *Plast Reconstr Surg.* 2021;147(1S-2):43S-49S. doi: 10.1097/PRS.0000000000007620.

ANEXOS

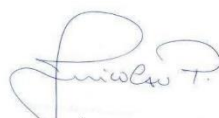
Anexo 1.

ATESTADO

Atesto que o Projeto "Avaliação do ácido hialurônico administrado por via enteral e parenteral em retalhos cutâneos isquêmicos induzidos em ratos Wistar" **Protocolo CEUA 0166/2020**, a ser conduzido por Marina Frazatti Gallina, responsável/orientador Ivan Felismino Charas dos Santos, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	02/11/2020 a 01/02/2021
Nome Comum / Espécie / Linhagem	ROEDOR / RATTUS NOVERGICUS / Heterogênicos
Raça	Wistar
Nº de animais machos	68
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	400 gr
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	0 ano(s) e 3 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Biotério Cenyral, Botucatu.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 16/10/2020



JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu