

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.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os retalhos cutâneos são recursos importantes na área da cirurgia reconstrutiva, quer em pacientes humanos como na Medicina Veterinária, e amplamente usados na rotina cirúrgica de cães e gatos em falhas teciduais não passíveis de oclusão direta por meio de suturas (HEDLUND, 2008; KIRPENSTEIJN e HAAR, 2013).

As principais complicações associadas ao uso dos retalhos incluem a deiscência de suturas, edema, hematoma, infecção, seroma e necrose (KIRPENSTEIJN e HAAR, 2013; CUDDY, 2017). Essas complicações podem estar associadas à diminuição ou ausência de vascularização, uma vez que o fluxo sanguíneo dos retalhos cutâneos depende inicialmente da própria vascularização (base pedicular), e posteriormente pela neovasculogênese (CYMROT et al., 2004; PEDRETTI et al., 2017).

Durante a elevação do retalho para a realização da oclusão de feridas não passíveis de sutura direta, ocorre diminuição da perfusão sanguínea, principalmente na região mais distal ao pedículo, e posteriormente formação de necrose (KIRPENSTEIJN e HAAR, 2013; CUDDY, 2017; PEDRETTI et al., 2017). Diversas substâncias vêm sendo pesquisadas com a finalidade de minimizar os eventos deletérios dos retalhos cutâneos e melhorar a viabilidade, sendo que o ácido hialurônico (AH) é uma das substâncias usadas pesquisas na área de pesquisa (ALMEIDA et al., 2004; ESTEVES et al., 2005; MAYTIN, 2016; PEDRETTI et al., 2017; FALLACARA et al., 2018).

O AH é um polímero natural da família dos glicosaminoglicanos, presente em grande quantidade na matriz extracelular de humanos e animais, e identificado em maior concentração na pele (MAYTIN, 2016; FALLACARA et al., 2018). Além da função estrutural e homeostática cutânea, o AH participa ativamente de todo o processo cicatricial cutâneo, como uma molécula sinalizadora, imunomodulação, como antioxidante, entre outras (HUMBERT et al., 2013; AYA e STERN, 2014; LEE et al., 2016; LITWINIUK et al., 2016; MAYTIN, 2016; FALLACARA et al., 2018; ABATANGELO et al., 2020; IACOPETTI et al., 2020; KAUL et al., 2021; LEITE e FRADE, 2021).

Paralelamente, o AH exógeno possui ação anti-inflamatória, e o seu uso por via oral apresentou uma distribuição cutânea significativa (BALOGH et al., 2008; PAULOIN et al., 2008; LAW et al., 2013; ZHONG et al., 2016). Ele já foi reportado como agente protetor no ressecamento e espessamento da pele submetida à radiação ultravioleta (KAWADA et al., 2015). Contudo, até o presente momento, a comparação do AH exógeno por via oral e local em retalhos isquêmicos estão ausentes na literatura.

Visto que para que ocorra a viabilidade do retalho cutâneo deve existir a estimulação da neovasculogênese e inibição da inflamação exacerbada, o presente estudo tem 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 inflamatórios teciduais. A hipótese é que o uso do AH exógeno por via enteral ou parenteral tenha efeitos benéficos em retalhos cutâneos isquêmicos em ratos Wistar, quando comparados com os grupos tratados com água destilada e solução salina (0,9%).

O estudo se justificou porque avaliou os efeitos da administração do AH exógeno por diferentes vias (enteral e parenteral) em modelo de retalho cutâneo isquêmico. Os resultados do presente estudo podem servir de base para uso do AH exógeno em retalhos cutâneos de cães e gatos, visto que a necrose é considerada uma das complicações mais observadas em cirurgias reconstrutivas usando retalhos cutâneos. Paralelamente, não existem pesquisas relacionadas com a comparação do uso do AH exógeno por ambas as vias em retalhos cutâneos isquêmicos tornando o presente estudo inédito.

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cicatrização

A cicatrização é um processo dinâmico que envolve eventos celulares e bioquímicos iniciado por um estímulo físico lesional e pela sinalização química, que decorre da ativação de células teciduais locais e sistêmicas (BALBINO et al., 2005). Os elementos teciduais fragmentados (colágeno, elastina, fibronectina) e proteínas séricas que entram em contato com a matriz extracelular induzem a liberação de mediadores inflamatórios pré-formados pela degranulação das plaquetas, mastócitos e terminações nervosas periféricas (BALBINO et al., 2005; HOSGOOD, 2006).

Por sua vez, os mediadores inflamatórios primários se ligam aos receptores celulares locais induzindo modificações no seu metabolismo, e amplificando a produção de novos mediadores, como o eicosanóide, interleucinas inflamatórias, fatores de crescimento, neuropeptídeos e proteínas de adesão leucocitária (BALBINO et al., 2005; ISAAC et al., 2010). Em seguida, ocorre a mobilização de neutrófilos e monócitos; migração de queratinócitos e fibroblastos; angiogênese; produção de colágeno e deposição de matriz extracelular; e reepitelização (BALBINO et al., 2005).

2.2 Retalhos cutâneos

A vascularização cutânea é um sistema interligado composto pelo plexo subdérmico localizado na região subcutânea; e pelo plexo médio e superficial, ambos localizados na região da derme (KIRPENSTEIJN e HAAR, 2013; PAVLETIC, 2018). O plexo subdérmico é de grande importância nas cirurgias reconstrutivas, visto que é formado pelas terminações das artérias e veias cutâneas diretas responsáveis pela perfusão de grandes áreas dérmicas (PAVLETIC, 2018).

Os retalhos cutâneos são constituídos por pele e tecido subcutâneo, e um pedículo da área doadora o qual mantém a circulação sanguínea durante a confecção e transferência para área receptora (PAVLETIC, 2018). Ele é derivado da elevação cutânea, e posterior deslocamento e reposicionamento no leito receptor (CYMROT et al., 2004; PAVLETIC, 2018). Durante a confecção

dos retalhos pode ocorrer comprometimento circulatório de período variável e transitório, e caso a isquemia seja prolongada pode resultar em necrose tecidual (CYMROT et al., 2004).

A classificação primária está relacionada com a vascularização, e divide os retalhos cutâneos em dois grandes grupos: retalhos de padrão subdérmico associado ao plexo vascular subdérmico; e os de padrão axial, que além do plexo vascular subdérmico também possuem vasos cutâneos diretos (KIRPENSTEIJN e HAAR, 2013; PAVLETIC, 2018).

A cicatrização desses retalhos ocorre por primeira intenção, tornando as fases do processo de cicatrização mais curtas, e na maioria das vezes algumas das fases não são identificadas (ex. formação do tecido de granulação) (HONRADO e MURAKAMI, 2005; KIRPENSTEIJN e HAAR, 2013). Após a remoção das suturas, que varia entre sete a 10 dias, em cães e gatos, os bordos da ferida são mantidos unidos por fibrina, com cerca de 5% da força de tração, e sua resistência final não ultrapassa 80% (HONRADO e MURAKAMI, 2005).

A região do retalho cutâneo distal ao pedículo vascular é considerada mais susceptível aos eventos isquêmicos devido ao menor suprimento sanguíneo (PEDRETTI et al., 2017), e para a manutenção da viabilidade dos retalhos cutâneos, é necessário que não ocorra isquemia prolongada, mesmo que o ocorra interrompimento parcial e temporário do fluxo sanguíneo, e liberação de mediadores inflamatórios, que resultam em vasoconstrição primária (PEDRETTI et al., 2017). Outros eventos que podem potencializar e prolongar a isquemia incluem o trauma cirúrgico excessivo, posicionamento do retalho com a presença de dobras, torção do pedículo vascular, edema, trombos, inflamação, hematoma, e a relação entre a extensão do pedículo e a área do retalho (ALMEIDA et al., 2004; MOLNAR, et al., 2019).

2.3. Ácido hialurônico

O AH é um polímero natural de cadeia linear não sulfatado, constituído por dissacarídeos *N*-acetil-d-glucosamina e ácido glucurônico e com ligações β -1,4-glicosídicas, pertencente ao grupo dos glicosaminoglicanos (FALLACARA et al., 2018). A sua síntese é realizada na face interna da membrana plasmática pelas hialuronato sintases, e formam cadeias longas, atingindo mais de 10^4 kDa

de massa molecular, contudo, existem AH com baixo peso molecular (AYA e STERN, 2014; FALLACARA et al., 2018).

O AH é identificado ao redor das células epiteliais, tecido conjuntivo e nervoso, líquido sinovial, humor vítreo, cordão umbilical, cepas bacterianas, sendo que a sua maior concentração é identificada na pele (AYA e STERN, 2014; FALLACARA et al., 2018; ABATANGELO et al., 2020). A degradação é tecidual pelas enzimas hialuronidases, e no meio intracelular por meio de lisossomos (ABATANGELO et al., 2020). O catabolismo é realizado localmente ou sistêmico por meio de células endoteliais e de vasos linfáticos (FALLACARA et al., 2018).

O AH possui um papel estrutural devido à sua elevada hidrofiliidade, e quando é de alto peso molecular ocorre a formação de uma substância viscosa (FALLACARA et al., 2018; ABATANGELO et al., 2020). Além de ser uma molécula estrutural passiva, possui um papel importante em diversos processos biológicos como molécula sinalizadora (FALLACARA et al., 2018).

2.3.1 Ácido hialurônico exógeno

Inicialmente, o AH era derivado da crista de galo e cordão umbilical, contudo, com advento da biotecnologia, na última década do século XX, se consolidou a sua obtenção por meio da fermentação bacteriana (BOERIU et al., 2013), sendo que a maioria do AH comercial é obtido por meio da fermentação das bactérias do gênero *Streptococcus* (VOIGT e DRIVER, 2012; FALLACARA et al., 2018).

O AH de alto peso molecular (> 900 kDa) possui atividade anti-inflamatória, modulando o recrutamento de células inflamatória, ao contrário do AH de baixo peso (< 120 kDa), que promove a angiogênese e a remodelação tecidual (LITWINIUK et. al, 2016; ABATANGELO et al., 2020; KAUL et al., 2021). Durante o processo de hemostasia, o AH liga-se ao fibrinogênio estabilizando o coágulo e a sua fragmentação por meio da ação das hialuronidases plaquetárias, induz a atração dos leucócitos polimorfonucleares e limita a ação das mieloperoxidases e assim, diminui a intensidade da resposta inflamatória (AYA e STERN, 2014). A maior fragmentação do AH parece induzir a migração de macrófagos para a ferida, e maior expressão do fator de necrose tumoral alfa

(FNT- α) e outras interleucinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 beta (IL-1 β) (AYA e STERN, 2014; LITWINIUK et al., 2016).

O AH modula a expressão do fator de crescimento vascular endotelial; estimula a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno tipo III e outros componentes da matriz extracelular; induz um ambiente bioquímico para que ocorra a migração dos fibroblastos; e regula a migração de queratinócitos no processo de reepitelização por meio do complexo AH-receptor CD44 (AYA e STERN, 2014).

Estudos realizado por Humbert et al. (2013) e Lee et al. (2016), evidenciaram maior taxa de cura, e em menor tempo, em pacientes humanos diagnosticados com úlceras diabéticas e venosas, tratados com o AH. O AH de peso molecular alto (1000 kDa) associado ao iodopovidine demonstrou promover melhor cicatrização, por meio do aumento da neovascularização e ação anti-inflamatória em ratos diabéticos (CHEN et al., 2019).

Iacopetti et al. (2020), utilizaram pomada de AH (0,2%) em feridas cutâneas em ovelhas, e identificaram um processo de cicatrização mais curto, como também, maior estímulo na formação dos anexos cutâneos. Paralelamente, Leite e Frade (2021), demonstraram em seu estudo, que a mesma pomada induziu a reepitelização mais rápida em feridas abrasivas de ratos.

Com relação aos retalhos cutâneos isquêmicos, Shalom et al. (2008) não identificaram diferenças significativas entre os ratos tratados com AH injetável (1%) e com solução salina (0,9%), aplicados no leito do retalho logo após o procedimento cirúrgico e avaliados por meio de marcação por fluoresceína.

Estudos do uso do AH por via oral em retalhos isquêmicos estão ausentes na literatura. Balogh et al. (2008), identificaram a presença de AH radioativo na pele de ratos após quatro horas da administração oral do AH de alto peso molecular (1100 – 1500 kDa). Esse fato foi corroborado por Oe et al. (2014) e Kimura et al. (2016), em ratos, quando se fez o uso do AH de diferentes pesos moleculares (300 e 920 kDa) na dose variando de 25 e 200 mg/kg.

2.4 Biomarcadores inflamatórios

O aumento de cálcio intracelular durante a isquemia promove a ativação das fosfolipases, e desse modo, aumentando os eicosanoides e subprodutos do ácido araquidônico (GRANGER et al., 2015). Os eicosanoides amplificam a resposta inflamatória aumentando a concentração de interleucinas pró-inflamatórias (ex. FNT α e IL-1 β) e favorecendo a interação neutrófilo-célula endotelial (GRANGER et al., 2015). Essa interação parece promover o acúmulo de neutrófilos e, assim, prejudicar o fluxo sanguíneo da microcirculação (CAMPOS e YOSHIDA, 2004).

As interleucinas inflamatórias (pró e anti-inflamatórias) são proteínas não estruturais e mediadores na resposta inflamatória (DINARELLO, 2000; De OLIVEIRA et al., 2011). A IL-1 β e o FNT α são as primeiras interleucinas pró-inflamatórias a serem produzidas no local do trauma tecidual, e são sintetizadas, principalmente, pelos macrófagos, como também pelos fibroblastos e células endoteliais lesionadas (De OLIVEIRA et al., 2011). Elas agem na cascata inflamatória aumentando a síntese de outros mediadores inflamatórios, que incluem o fator ativador de plaquetas, leucotrienos, prostaglandinas e óxido nítrico, além de outras interleucinas (DINARELLO, 2000; De OLIVEIRA et al., 2011; GRANGER et al., 2015). Ambas as interleucinas estão entre as principais interleucinas pró-inflamatórias inatas agudas (amplificadores potentes da inflamação) e são correlacionadas com o aumento sérico em distintas lesões, como as resultantes de doenças cardiovasculares, isquemia-reperfusão pulmonar e lesão traumática encefálica. Elas promovem o recrutamento e ativação de leucócitos e induzem a degradação da matriz extracelular por indução de metaloproteinases (RODNEY et al., 2018; LIANG et al., 2019; HANNA e FRANGOIANNIS, 2020; AIN et al., 2021).

A interleucina 6 (IL-6) é outra citocina pró-inflamatória liberada precocemente após a lesão tecidual (DINARELLO, 2000; De OLIVEIRA et al., 2011). Possui atividade pleiotrópica, por meio da circulação sanguínea induz o fígado à liberação de proteínas de fase aguda, como a proteína C - reativa, amiloide A, fibrinogênio, complemento C3, haptoglobina e trombopoietina (De OLIVEIRA et al., 2011; TANAKA et al., 2014). Paralelamente, ativa células endoteliais vasculares e estimula a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEFG), e desse modo, aumenta a permeabilidade vascular gerando

edema intersticial (DINARELLO, 2000; De OLIVEIRA et al., 2011; TANAKA et al., 2014). Também promove a ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e diferenciação dos linfócitos T citotóxicos e células natural *killer* (DINARELLO, 2000; De OLIVEIRA et al., 2011; TANAKA et al., 2014). Ela é secretada por diferentes células que incluem os macrófagos ativados, monócitos, eosinófilos e os hepatócitos (De OLIVEIRA et al., 2011; TANAKA et al., 2014).

Dentre as interleucinas anti-inflamatórias, a interleucina 10 (IL-10) possui destaque visto que atua em diversas células imunes, em relação aos macrófagos, promove a diminuição da sua atividade, assim como, suprime a ação de células natural *killer*, e atua, também, sobre os linfócitos B e T (SARAIVA e O’GARRA, 2010; De OLIVEIRA et al., 2011). A IL-10 limita as respostas inflamatórias exacerbadas associadas com as interleucinas pró-inflamatórias, principalmente a IL-1 β e IL-6 e FNT α , sendo associada à prevenção de afecções inflamatórias e autoimunes (SARAIVA e O’GARRA, 2010; De OLIVEIRA et al., 2011).

A significância clínico-patológica dessas interleucinas no processo inflamatório faz com que as suas mensurações a nível tecidual sejam importantes na avaliação de diferentes produtos em feridas abertas e retalhos cutâneos (SILVA et al., 2015; UCHIYAMA et al., 2015; HUANG et al., 2019; BESERRA et al., 2020; FENG et al., 2020), visto que são biomarcadores da inflamação exacerbada.

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.; CASTAÑON, 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.

CAPÍTULO 2

TRABALHO CIENTÍFICO

Artigo científico a ser enviado para Acta Cirúrgica Brasileira (<https://www.scielo.br/j/acb/>). O trabalho científico será traduzido para a língua inglesa para submissão. O corpo do texto foi formatado de acordo com as normas de submissão da revista, com exceção das figuras e legendas que foram inseridas no texto.

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

Resumo

Objetivo: Avaliar o ácido hialurônico exógeno de fermentação bacteriana por via enteral e parenteral em retalhos cutâneos isquêmicos induzidos em ratos, por meio de exames clínicos, histológicos e biomarcadores inflamatórios teciduais.

Material e métodos: 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.

Resultados: Foi identificado menor porcentual de necrose nos ratos tratados com o do 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.

Conclusão: 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. Contudo, o AH (0,3%) administrado por via parenteral (local) evidenciou melhores resultados no porcentual de necrose e de epitelização.

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

Introdução

Os retalhos cutâneos consistem na elevação cutânea, deslocamento e reposicionamento em um novo leito receptor, o que gera um comprometimento circulatório de período variável e transitório [1-3]. Para que ocorra a sobrevivência do retalho é necessário que não ocorra isquemia prolongada ou necrose, sendo que esses fatores podem estar associados ao trauma cirúrgico, processo inflamatório exacerbado, bem como as alterações decorrentes do restabelecimento da circulação sanguínea, uma vez que o fluxo sanguíneo dos retalhos cutâneos depende inicialmente da própria vascularização, e posteriormente pela neovasculogênese [1-5]. Desse modo, existe a necessidade do uso de substâncias que diminuam os efeitos deletérios e, consequentemente, aumentem a viabilidade dos retalhos cutâneos [1-3,5]. O ácido hialurônico (AH) é um biopolímero da família dos glicosaminoglicanos identificado em maior concentração na pele, e usado na cicatrização de feridas, devido as suas propriedades hidrosscópicas, homeostáticas, imunomoduladora, anti-inflamatória e antioxidante, e como molécula sinalizadora no processo de cicatrização cutânea [5-15].

O mecanismo de ação do AH por via oral não está completamente elucidado, porém já foi identificado ao nível da pele e outros tecidos [16-20]. Até o presente momento, a comparação do AH exógeno por via oral e local em retalhos isquêmicos estão ausentes na literatura, desse modo, objetiva-se com o presente estudo, avaliar o AH exógeno por via enteral e parenteral em retalhos cutâneos isquêmicos induzidos em ratos Wistar. A hipótese é que o AH exógeno, por via enteral ou parenteral, tenha efeitos benéficos nos retalhos cutâneos isquêmicos em ratos Wistar, quando comparados com os grupos tratados com água destilada e solução salina (0,9%).

Material e Métodos

Animais e ambiente de experimentação

A metodologia adotada no presente estudo foi analisada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), campus de Botucatu, São Paulo (SP) (atestado nº 0166/2020) (ANEXO 1).

Foram utilizados 64 ratos hípidos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, heterogênicos, convencionais, machos não submetidos à contracepção cirúrgica, com idade entre 12 e 14 semanas, e massa corpórea entre 300 e 400 g. Os animais foram cedidos pelo Biotério Central de Criação e Manutenção da Unesp, campus de Botucatu, SP. Adicionalmente, quatro ratos foram usados como controle negativo das análises dos biomarcadores inflamatórios.

Os ratos foram submetidos à ambientalização ao ambiente de experimentação durante 14 dias, e mantidos em grupos de quatro animais em caixas plásticas de polisulfona (497 mm x 341 mm x 265 mm). Os animais receberam água filtrada e ração comercial para ratos *ad libitum*.

O ambiente experimental manteve-se climatizado, com controle de temperatura (23° C), umidade variando entre 40 e 60%, e ciclos de claro/escuro de 12 horas. Nesta fase, foi realizada a vermifugação com ivermectina (1%) (Ivomec®, Merial Saúde Animal Ltda., Paulínia, São Paulo) (0,1 mL diluída em 100 mL de água potável em bebedouro coletivo), a cada sete dias, durante 14 dias [21]. Após a ambientalização, os ratos foram alocados individualmente em caixas de polisulfona (385 mm x 251 mm x e 240 mm), e foi usado papel sulfite amassado como enriquecimento ambiental. As caixas foram limpas a cada 48 horas com água e sabão neutro.

Procedimento experimental

Confecção dos retalhos cutâneos isquêmicos

Os 64 ratos foram submetidos à realização de retalhos cutâneos isquêmicos após pré-medicação anestésica com sulfato de morfina [2 mg/kg, por via subcutânea (SC)], e posteriormente anestesiados com associação de xilazina (10 mg/kg) e cloridrato de cetamina (75 mg/kg), por via intraperitoneal (IP).

A região dorsal foi submetida à tricotomia ampla utilizando uma máquina de tricotomia, e a antissepsia foi realizada com clorexidina alcoólica (0,5%). Em seguida, foi realizado uma demarcação do retalho de 3 cm de largura e 10 cm de comprimento no dorso dos ratos utilizando um molde pré-confeccionado e caneta de marcação cirúrgica, tendo como limites anatômicos a região caudal das escápulas, e a linha média dorsal como o centro do retalho [22] (Figura 1A). Após a demarcação, procedeu-se incisão cutânea com bisturi com lâmina nº 20, e dissecação romba com tesoura Metzembaum para elevação do retalho incluindo o músculo panniculus carnosus (Figura 1B). Após o reposicionamento, foi realizada a sutura das margens, com fio de sutura náilon 4-0, utilizando o padrão interrompido simples, com espaçamento de 0,5 cm entre os pontos de sutura (Figura 1C).



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).

Para o controle da dor pós-operatória foi administrado o cloridrato de tramadol (10 mg/kg, SC), a cada 12 horas, durante 48 horas. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados pela mesma pessoa com experiência em cirurgia, sempre no mesmo horário (07:00 horas), e utilizando os protocolos de assepsia.

Grupos experimentais

Após a confecção dos retalhos cutâneos, os ratos foram alocados aleatoriamente, utilizando o programa Randomizer® (2018), em quatro grupos de 16 animais, de acordo com o tratamento: solução salina (0,9%) (SC) – G1; água destilada por via oral (VO) – G2; AH (0,3%) (SC) – G3 e AH (1%) (VO) – G4.

Após a dermorrafia, os ratos dos grupos G1 e G3 foram submetidos à administração de dose única de 1,5 mL de respectivas substâncias, no leito do retalho cutâneo, com o objetivo de contemplá-lo totalmente. Para tal, foi usada uma microcânula atraumática (0,90 mm x 100,0 mm) (Fabinject Ind. Com. Imp. Exp. Eireli, Taubaté, São Paulo) acoplada em uma seringa estéril de 3 mL. A microcânula foi inserida entre os pontos de sutura localizados na extremidade distal, e as substâncias foram administradas no sentido craniocaudal, por meio do deslocamento da microcânula.

Nos ratos do grupo G2 foi administrado água destilada (0,9 mL), e nos do grupo G4, o AH (1%), na dose de 0,025 mg/g [17], por meio de gavagem, utilizando uma cânula curva e rígida (1,20 mm x 39,0 mm) (Ciencor Scientific LTDA, Barra Funda, São Paulo). Ambos os tratamentos tiveram início oito horas antes da confecção dos retalhos cutâneos, e foram repetidas a cada 24 horas, durante sete dias [18,19].

Todos os tratamentos foram realizados no mesmo período do dia (07:00 horas), e pelas mesmas pessoas, seguindo os procedimentos de assepsia estéreis. O estado clínico geral dos animais e da ingestão de alimentos e água foi realizada a cada 24 horas, por meio de observação dos respectivos recipientes. Durante o período do estudo, não foi administrado nenhum antibiótico, anti-inflamatório ou realizada a limpeza da ferida cirúrgica, com o intuito de não influenciar com os resultados.

Aquisição das substâncias

A solução salina injetável estéril (0,9%) (Eurofarma®, Ribeirão Preto, São Paulo) e a água destilada estéril (Samtec®, Ribeirão Preto, São Paulo) foram obtidas em distribuidora hospitalar.

O AH de fermentação bacteriana foi importado liofilizado (pó) sob a forma farmacêutica de hialuronato de sódio, grau injetável de pureza, de peso molecular de 1400 ~ 2000 kDa, podendo ser utilizado por via enteral ou parenteral de acordo com o fabricante (Bloomage Freda Biopharm Company, LTD, Jinan, China). A diluição foi realizada cinco minutos antes do seu uso, sendo que para administração enteral foi realizada uma diluição de 1% com água destilada estéril, e para a via parenteral a diluição foi de 0,3% em solução salina (0,9%) estéril.

Variáveis avaliadas

Todos os ratos foram submetidos à avaliação clínica, que incluiu a mensuração da massa corpórea (MC) e da temperatura retal (TR); avaliação macroscópica dos retalhos (presença de deiscência de sutura, de hematoma, seroma, contaminação/infecção e porcentual de necrose); avaliação dos biomarcadores inflamatórios teciduais e exame histológico.

As variáveis MC e a TR foram avaliadas 10 minutos antes da confecção dos retalhos cutâneos (M0), no terceiro dia (M3d) e no sétimo dia após (M7d) a confecção dos retalhos.

A avaliação macroscópica foi realizada a cada 24 horas durante sete dias. O porcentual de necrose, a avaliação dos biomarcadores inflamatórios e histológica, foi realizada nos momentos M3d e M7d. As avaliações foram realizadas sempre pelo mesmo avaliador independente, e no mesmo horário (07:00 horas), utilizando a metodologia encoberta.

Avaliação clínica

A mensuração da MC e da TR foi realizada por meio de uma balança digital de precisão (Toledo®, Mettler - Toledo Ind. e Com. Ltda., Barueri, São Paulo) e de um termômetro digital retal (G-tech®, Center Medical, Barueri, São Paulo), respectivamente.

A avaliação macroscópica foi determinada pela presença ou ausência de deiscência de sutura, hematoma, seroma, contaminação/infecção e posteriormente armazenados em uma planilha Excel® para posterior análise estatística descritiva.

Para a avaliação do percentual de necrose, os retalhos foram fotografados utilizando uma câmera fotográfica digital (Sony®, modelo Cyber-shot DSC-WX50) com resolução de 16,2 megapixels com imagem no formato JPEG®, e luz artificial (anel de luz led). A câmera foi fixada perpendicularmente aos retalhos por meio de um suporte específico, com o objetivo de reduzir as distorções produzidas pela inclinação da câmera. Foi padronizada uma altura de 25 cm entre a câmera e o retalho, aferida por meio da régua plástica transparente (30 cm de comprimento). Paralelamente, uma fita métrica (100 cm de comprimento) foi colocada do lado do animal com a finalidade de servir de referência métrica para o cálculo das áreas utilizando o software ImageJ® (National Institutes of Health, NIH). Três fotografias com o flash desligado foram realizadas para obtenção de um valor médio.

O percentual de necrose foi determinada pela fórmula segundo a literatura Camargo et al. (2014) [22]:

$$\% \text{ necrose} = \frac{\text{Área de necrose}}{\text{Área total do retalho}} \times 100\%$$

Avaliação dos biomarcadores inflamatórios teciduais e avaliação histológica

Oito ratos de cada grupo foram selecionados aleatoriamente, e eutanasiados, utilizando a associação de xilazina (2%) (30 mg/kg) e cloridrato de cetamina (1%) (180 mg/kg) (IP), nos momentos M3d e M7d, e seus retalhos foram submetidos a avaliação dos biomarcadores inflamatórios e exames histológicos.

Para a coleta dos retalhos considerou-se a região com ausência de alterações macroscópicas cranial à necrose, preconizando o lado direito do retalho para a coleta das amostras para a avaliação das interleucinas inflamatórias, e o lado contralateral, para a realização dos exames histológicos.

As amostras para avaliação das interleucinas inflamatórias foram colocadas em *Eppendorfs* e imergidas em nitrogênio líquido (-196° C) e armazenadas à -80° C. Foram avaliadas as interleucinas pró-inflamatórias que incluíram a IL-1 β , IL-6 e o FNT- α . A IL-10 foi usada como marcador anti-inflamatório. Foi realizado a homogeneização das amostras na proporção 1:5 (peso da amostra em mg: volume de tampão em μ L) com tampão fosfato salino de pH 7.4 e coquetel inibidor de protease (99:1) (Sigma-Aldrich®, Merck, Barueri, SP), e em seguida foi efetivada a centrifugação do homogenato por 15 minutos a 10.000 rpm e 4° C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado para a quantificação de proteínas e análises proteicas.

A quantificação de proteínas totais foi realizada por meio do kit de detecção de proteínas Interkit Proteínas Totais (Interteck Katal, SP), com a quantificação sendo realizada pelo método de biureto de acordo com as instruções da empresa. As proteínas totais foram determinadas para que os dados dos parâmetros analisados fossem expressos em relação à quantidade de proteínas da amostra em miligramas. Após o processamento das amostras, o sobrenadante foi usado para determinar os níveis das interleucinas por meio do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) utilizando kits comerciais para cada interleucinas (R&D Systems, Minneapolis, EUA), de acordo com os protocolos e concentrações fornecidos pela empresa.

Os espécimes para avaliação histológica foram colocados em frascos de solução de Alfac®, durante 24 horas, e posteriormente, mantidas em álcool 70% até a inclusão em parafina. Foram realizados cortes de 5 μ m e coloração pelo método de hematoxilina-eosina (H&E) para avaliação geral do tecido. A quantidade de colágeno total foi determinada pela coloração Tricômio de Masson.

Para a avaliação histológica, foram realizadas análises por meio de fotomicrografias do centro dos retalhos utilizando dez campos em magnificação de 40X, totalizando uma área de 100.000 μ m². A análise morfométrica abrangeu o número de vasos sanguíneos/campo; células inflamatórias totais/campo e colágeno total/campo, e para a espessura da epiderme (μ m) procederam-se dez medições por campo. As avaliações morfométricas foram realizadas por meio do software CellSens Standard (Olympus, Center Valley, PA, EUA) e as

mensurações pelo software AVSoftBioView. Os parâmetros foram quantificados e inseridos em planilhas Excel® para posterior análise estatística.

Análise estatística

Para análise estatística foram utilizados os softwares R (Version 4.0.5 - © 2021, R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria) e o Excel Versão 16.0.6742.2048 – 2019, Microsoft, Washington, Estados Unidos). Procedeu-se cálculo de estatística descritiva das variáveis quantitativas por meio da média, desvio padrão, mediana, valores máximo e mínimo, primeiro e terceiro quartis.

A suposição de normalidade foi avaliada pelo Teste Shapiro-Wilk, nos casos em que a suposição de normalidade foi atendida utilizou-se o teste paramétrico Teste t para amostras dependentes e independentes. Nos casos que a suposição de normalidade não foi atendida foi usado o Teste de Wilcox. Na comparação entre os grupos experimentais utilizou-se o Teste ANOVA quando a suposição de normalidade foi atendida, quando não, utilizou-se o Teste de Kruskal-Wallis. Em todas as comparações considerou-se como diferença significativa valor de probabilidade inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

Resultados

Avaliação clínica

Durante o período do estudo não foi identificado diminuição da ingestão de alimentos e água, e presença de diarreia e óbitos. Paralelamente, não foram observadas reações cutâneas resultantes da aplicação do AH.

A MC não demonstrou variação significativa entre os grupos por momento avaliado. Contudo, ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em todos os grupos entre M0 e o M3d (Tabela 1). Os valores da TR não apresentaram diferenças estatísticas (Tabela 2).

Não foi evidenciada presença de hematoma, seroma ou contaminação em nenhum dos grupos. Foi identificada deiscência de um ponto de sutura na região distal à base do retalho, 24 horas após, porém, sem resultar na abertura do retalho. A incidência foi de: 62,5% (10/16) - grupo tratado com o

AH (1%) por via enteral; 56,3% (9/16) - grupo tratado com o AH (0,3%) por via parenteral; 50% (8/16) – grupo tratado com a água destilada por via oral; 37,5% (6/16) – grupo tratado com solução salina (0,9%) por via parenteral.

Em todos os grupos, o início da necrose ocorreu 48 horas após à confecção dos retalhos, e com aumento da área necrosada até sete dias após à indução dos retalhos (Figura 2).

Todos os grupos apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao percentual de necrose, sendo identificado um aumento entre o M3d M7d. Na avaliação intragrupos, foi evidenciado diferença significativa ($p < 0,05$) entre os animais do grupo submetido ao tratamento com o AH (0,3%) por via parenteral (G3) e os animais tratados com o AH (1%) por via enteral (G4) ($G4 > G3$), sete dias após à indução dos retalhos (Tabela 3).

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.

Grupos	M0	M3d	M7d
	Med (min – max)	Med (min – max)	Med (min – max)
G1	342,2 (301,6 - 370,7) ^{Aa}	333,7 (288,1 - 350,9) ^{Ba}	337,5 (323,5 - 383,4) ^{ABa}
G2	346,3 (331,3 - 370,8) ^{Aa}	334,5 (306,2 - 362,3) ^{Ba}	346,9 (331,4 - 392,1) ^{ABa}
G3	341,0 (303,5 - 370,5) ^{Aa}	329,6 (291,5 - 365,9) ^{Ba}	347,2 (307,9 - 372,7) ^{ABa}
G4	340,9 (284,1 - 399,7) ^{Aa}	324,4 (280,4 - 390,7) ^{Ba}	343,3 (329,6 - 407,1) ^{ABa}

Medianas seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa ao longo dos tratamentos ($p < 0,05$). Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças entre os grupos ($p < 0,05$).

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.

Grupos	M0	M1	M2
	Med (min – max)	Med (min – max)	Med (min – max)
G1	35,5 (33,5 - 36,8) ^{Aa}	35,7 (35,0 - 37,3) ^{Aa}	35,6 (34,5 - 36,0) ^{Aa}
G2	35,5 (32,3 - 36,6) ^{Aa}	35,1 (33,9 - 36,0) ^{Aa}	34,9 (34,4 - 36,0) ^{Aa}
G3	35,7 (34,6 - 36,4) ^{Aa}	35,6 (34,8 - 36,7) ^{Aa}	35,4 (34,3 - 37,3) ^{Aa}
G4	36,4 (33,2 - 37,3) ^{Aa}	36,1 (35,1 - 37,1) ^{Aa}	35,7 (34,6 - 37,0) ^{Aa}

Medianas seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa ao longo dos tratamentos ($p < 0,05$). Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças entre os grupos ($p < 0,05$). Valores de referência: 35,9° - 37,5° C (LAPCHIK et al., 2017).

Tabela 3 - Mediana (Med) e amplitude [mínima (min) e máxima (max)] do porcentual 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), e avaliados no terceiro dia (M3d) e no sétimo dia (M7d) após a confecção dos retalhos.

Grupos	M3d	M7d
	Med (min – max)	Med (min – max)
G1	13,58 (3,78 - 36,04) ^{Aa}	33,80 (21,19 - 56,19) ^{Bab}
G2	17,20 (0,70 - 34,01) ^{Aa}	42,13 (16,41 - 56,56) ^{Bab}
G3	10,52 (1,76 - 26,46) ^{Aa}	26,325 (8,55 - 51,05) ^{Ba}
G4	18,56 (0,00 - 38,70) ^{Aa}	50,401 (12,61 - 77,80) ^{Bb}

Medianas seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa ao longo dos tratamentos ($p < 0,05$). Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças entre os grupos ($p < 0,05$).

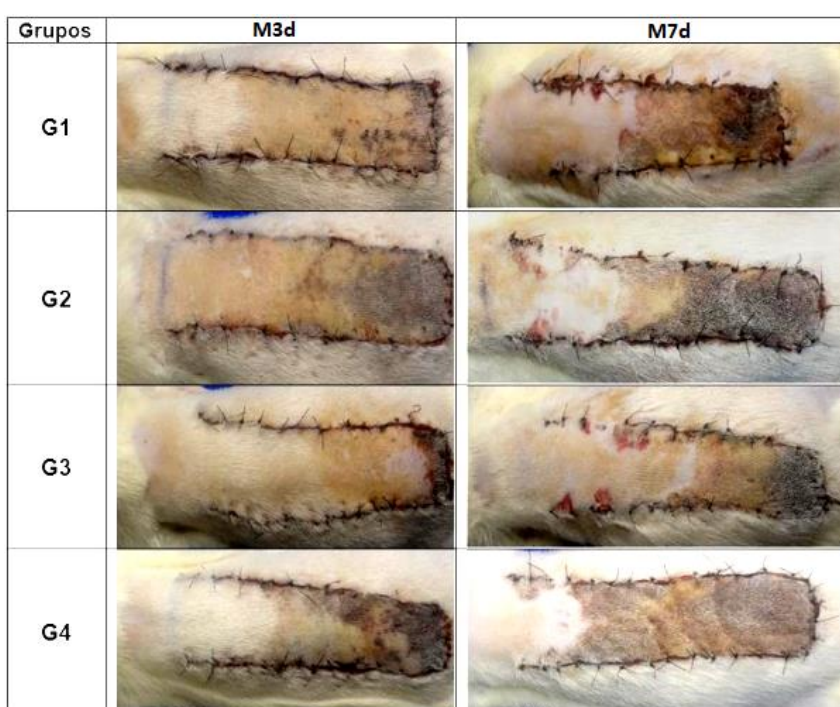


Figura 2 - Aspecto macroscópico da necrose dos retalhos cutâneos dorsais isquêmicos tratados com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1), água destilada por via enteral (G2), AH (0,3%) por via parenteral (G3), e AH (1%) por via enteral (G4), e avaliados no terceiro dia (M3d) e no sétimo dia (M7d) após a confecção dos retalhos.

Avaliação dos biomarcadores inflamatórios teciduais

Os valores da IL-1 β demonstraram um aumento significativo ($p < 0,05$) nos retalhos tratados com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1) entre ambos os momentos avaliados. Na avaliação intergrupos foi observado variações significativas ($p < 0,05$) em ambos os momentos: M3d - G1/G3/G4 > G2; M7d – G1 > G2 ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Em relação aos valores da IL-6, foi identificado um aumento significativo ($p < 0,05$) nos retalhos tratados com solução salina (0,9%) parenteral (G1) e nos tratados com água destilada por via enteral (G2) entre os momentos, porém, os valores do grupo G2 permaneceram no intervalo de referência da espécie. Paralelamente, no M3d foi evidenciado variações significativas ($p < 0,05$) similares do observado na avaliação da interleucina IL-1 β . No M7d foi identificado as seguintes variações estatísticas: G1/G3 > G2 ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Os valores do FNT α apresentaram variações significativas ($p < 0,05$) entre ambos os momentos, demonstrando um aumento significativo no grupo tratados com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1). Na avaliação entre os grupos foi constado variações significativas nos momentos avaliados: M3d – G1/G4 > G2; M7d – G1 > G2 ($p < 0,05$) (Tabela 4).

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.

Interleucinas Pró-inflamatórias	Grupos	M3d Med (min – max)	M7d Med (min – max)
IL-1 β	G1	41,88 (34,69 - 55,86) ^{Aa}	64,70 (50,22 - 79,66) ^{Ba}
	G2	17,96 (7,01 - 27,53) ^{Ab}	22,60 (16,07 - 30,43) ^{Ab}
	G3	39,14 (24,44 - 64,43) ^{Aa}	45,45 (15,81 - 91,38) ^{Aab}
	G4	44,88 (28,54 - 65,65) ^{Aa}	45,39 (42,72 - 66,782) ^{Aab}
IL-6	G1	59,59 (52,48 - 67,52) ^{Aa}	83,42 (56,41 - 189,95) ^{Ba}
	G2	26,33 (13,48 - 37,14) ^{Ab}	35,85 (23,74 - 40,58) ^{Bc}
	G3	52,22 (31,76 - 98,74) ^{Aa}	64,02 (36,37 - 127,36) ^{Aa}
	G4	59,99 (25,74 - 108,03) ^{Aa}	66,19 (34,23 - 98,31) ^{Aabc}
FNT α	G1	12,35 (5,18 - 19,43) ^{Aa}	17,21 (14,12 - 37,31) ^{Ba}
	G2	4,64 (2,24 - 7,89) ^{Ac}	6,05 (4,02 - 9,65) ^{Ab}
	G3	9,37 (4,14 - 28,17) ^{Aabc}	14,35 (5,59 - 34,44) ^{Aab}
	G4	10,50 (8,22 - 28,59) ^{Aab}	11,40 (2,64 - 30,57) ^{Aab}

Medianas seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa ao longo dos tratamentos ($p < 0,05$). Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças entre os grupos ($p < 0,05$). Referência do laboratório IL-1 β - 10,68 - 18,32 pg/mg de proteína; IL-6 - 19,44 - 38,64 pg/mg de proteína; FNT α - 2,38 - 9,06 pg/mg de proteína.

Na quantificação tecidual do biomarcador anti-inflamatório IL-10 foi identificado variações estatísticas ($p < 0,05$) entre o grupo tratado com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1) e o grupo tratado com água destilada via oral (G2) em ambos os momentos, sendo que os valores do grupo G1 foram significativamente ($p < 0,05$) maiores que G2 (Tabela 5).

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.

Grupos	M1	M2
	Med (min – max)	Med (min – max)
G1	13,57 (0,00 - 20,90) ^{Aa}	16,02 (11,42 - 28,29) ^{Aa}
G2	5,05 (0,00 - 7,92) ^{Ab}	5,91 (3,44 - 8,29) ^{Ab}
G3	11,37 (0,00 - 21,49) ^{Aab}	14,10 (0,00 - 27,99) ^{Aab}
G4	11,87 (0,00 - 24,85) ^{Aab}	12,81 (0,00 - 22,14) ^{Aab}

Medianas seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa ao longo dos tratamentos ($p < 0,05$). Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças entre os grupos ($p < 0,05$). Referência do laboratório: IL-10 - 0,00 – 7,83 pg/mg de proteína

Avaliação histológica

Os valores da espessura da epiderme demonstraram um aumento significativo ($p < 0,05$) nos retalhos tratados com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1) e com AH (1%) por via enteral (G4) entre os momentos avaliados. Na avaliação entre os grupos foi observado que o grupo G3 apresentou valores da espessura significativamente maiores ($p < 0,05$) dos demais grupos no M3d; e no M7d foi identificado que valores significativamente maiores ($p < 0,05$) no grupo G3 em relação ao grupo G2 (Tabela 6).

Na quantificação dos vasos sanguíneos houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos retalhos tratados com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1) e com AH (1%) por via enteral (G4) entre momentos avaliados. Somente no momento M3d foi identificada variação estatística ($p < 0,05$), onde o grupo tratado com o AH (1%) por via enteral (G4) apresentou valores maiores que o grupo tratado com água destilada via oral (G2) (Tabela 6).

Em relação ao número de células inflamatórias totais foi identificado variações significativas ($p < 0,05$) no momento M7d, sendo $G1 > G2$ (Tabela 6).

Na análise do colágeno total não foram identificadas diferenças significativas intragrupos e intergrupos (Tabela 6).

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.

Variáveis histológicas	Grupos	M3d	M7d
		Med (min – max)	Med (min – max)
Espessura da epiderme	G1	25,18 (12,57 – 49,84) ^{Aa}	28,975 (15,06 – 68,61) ^{Bab}
	G2	25,73 (13,82 – 61,11) ^{Aa}	26,78 (12,95 – 65,65) ^{Ab}
	G3	28,23 (13,81 – 52,98) ^{Ab}	29,39 (15,09 – 61,98) ^{Aa}
	G4	25,83 (10,45 – 50,71) ^{Aa}	27,74 (11,79 – 84,46) ^{Bab}
Vasos sanguíneos	G1	5,7 (4,6 – 7,0) ^{Aab}	4,6 (4 – 6,6) ^{Ba}
	G2	4,8 (3,8 – 5,7) ^{Aa}	4,4 (3 – 4,9) ^{Aa}
	G3	4,4 (3,2 – 7,5) ^{Aab}	4,7 (3,2 – 6,3) ^{Aa}
	G4	6,8 (4,5 – 12) ^{Ab}	4,4 (3,7 – 9,4) ^{Ba}
Células inflamatórias totais	G1	2750,4 (1347,0 – 3293,1) ^{Aa}	2721,8 (1997,4 – 4406,2) ^{Aa}
	G2	1839,7 (1603,5 – 2321,8) ^{Aa}	1828,4 (1572,9 – 2597,5) ^{Ab}
	G3	2284,9 (1155,4 – 3294,5) ^{Aa}	2837,6 (1615,9 – 3412,3) ^{Aab}
	G4	2742,8 (1435,2 – 3232,7) ^{Aa}	2200,4 (1984,8 – 3840,2) ^{Aab}
Colágeno total	G1	31506,4 (23279,2 – 40073,0) ^{Aa}	26956,0 (20629,0 – 32246,2) ^{Aa}
	G2	24026,2 (19865,6 – 38274,8) ^{Aa}	24667,6 (17430,8 – 29823,5) ^{Aa}
	G3	31070,1 (26136,6 – 34087,6) ^{Aa}	25497,1 (24098,2 – 37653,1) ^{Aa}
	G4	30232,3 (22819,7 – 42584,9) ^{Aa}	28336,3 (25276,4 – 33620,6) ^{Aa}

Medianas seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa ao longo dos tratamentos ($p < 0,05$). Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças entre os grupos ($p < 0,05$).

As figuras 3, 4, 5 e 6 representaram as fotomicrografias das variáveis histológicas avaliadas em todos os grupos em ambos os momentos.

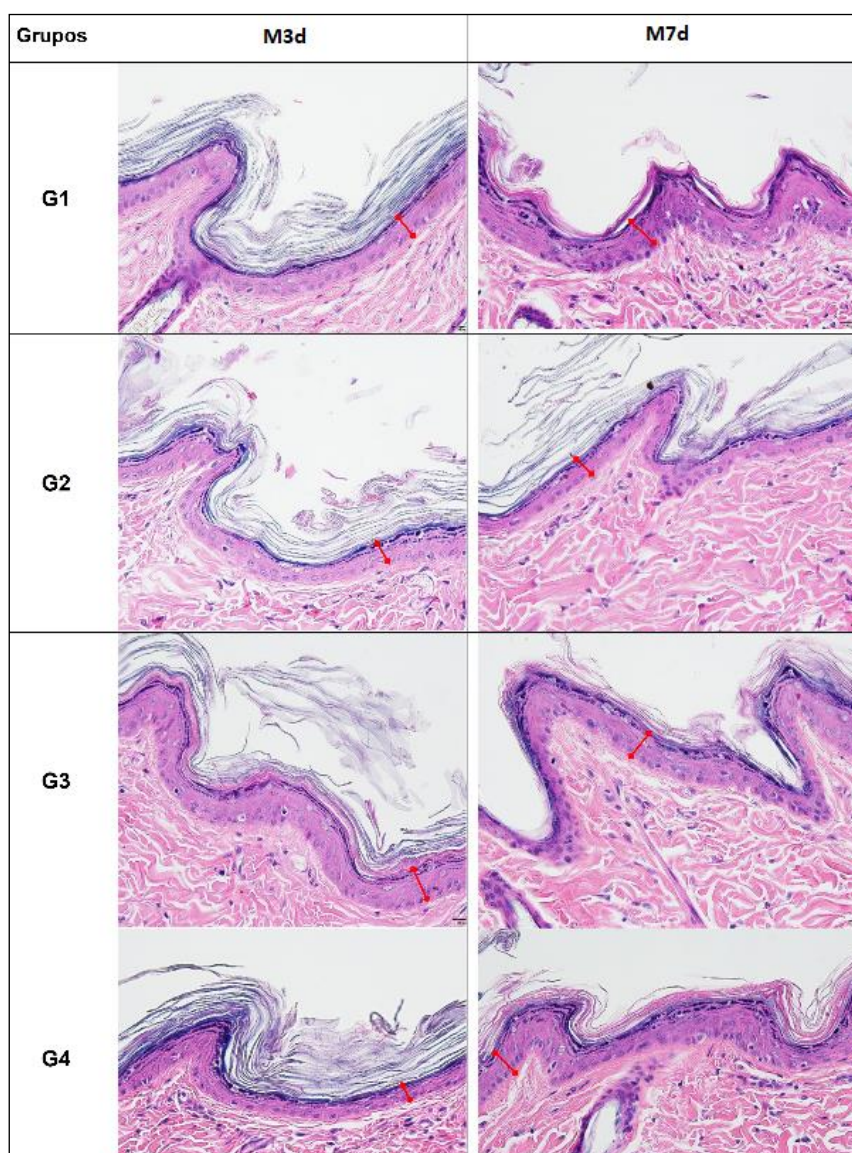


Figura 3 – Fotomicrografias da mensuração da espessura da epiderme (demarcação vermelha) dos retalhos isquêmicos tratados com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1), água destilada por via enteral (G2), AH (0,3%) por via parenteral (G3), e AH (1%) por via enteral (G4), avaliados no terceiro dia (M3d) e sétimo dia (M7d) após a confecção dos retalhos. (H&E, 40x, barra de escala 20 μ m).

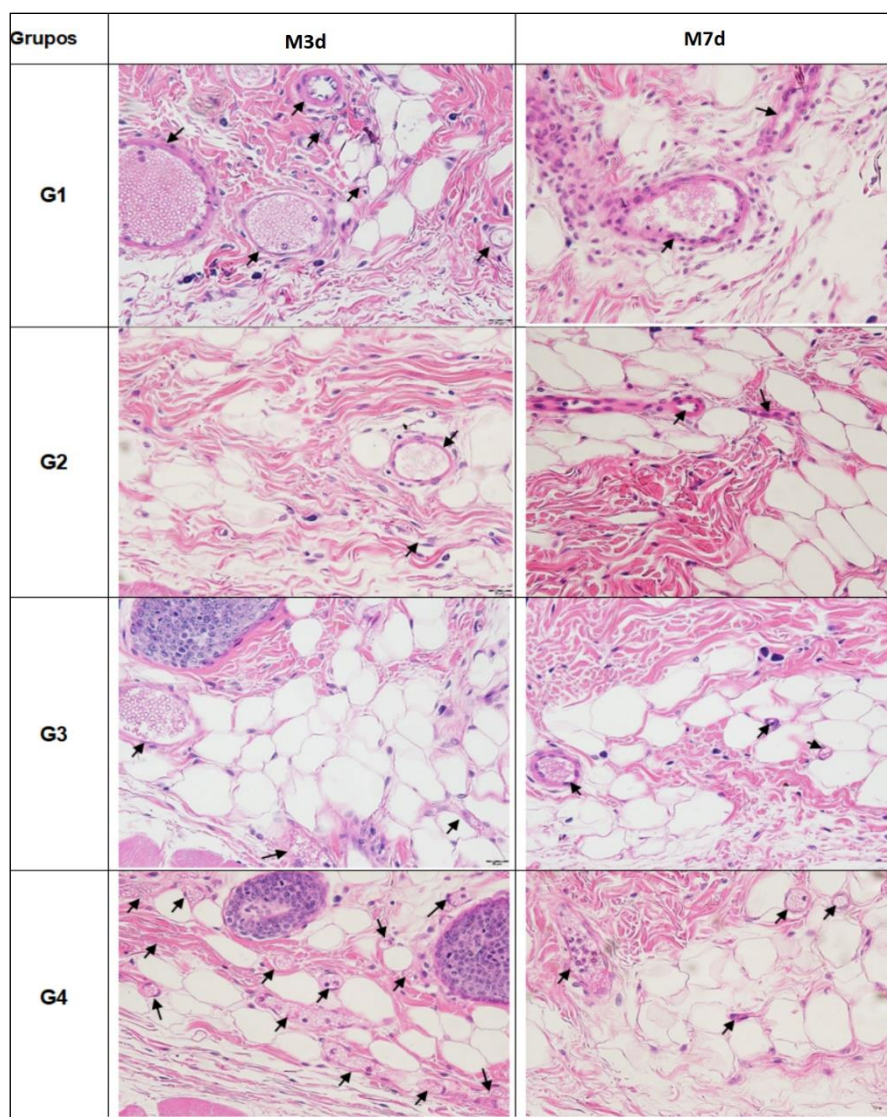


Figura 4 - Fotomicrografias da região da derme profunda dos retalhos isquêmicos tratados com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1), água destilada por via enteral (G2), AH (0,3%) por via parenteral (G3), AH (1%) por via enteral (G4), avaliados no terceiro dia (M3d) e sétimo dia (M7d) após confecção dos retalhos, ilustrando vasos sanguíneos (setas pretas) e células inflamatórias (núcleos corados em roxo) (H&E, 40x, barra de escala 20 μ m).

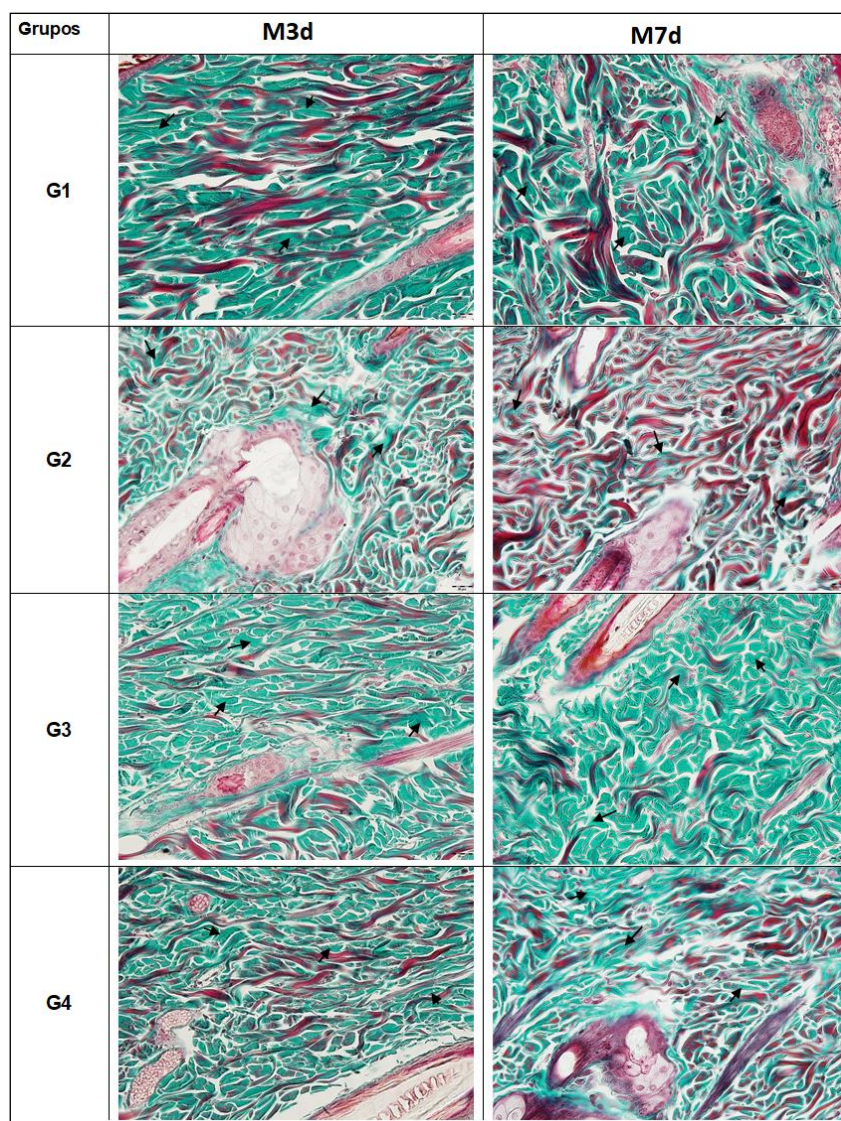


Figura 5 - Fotomicrografias da região dérmica dos retalhos isquêmicos tratados com solução salina (0,9%) por via parenteral (G1), água destilada por via enteral (G2), AH (0,3%) por via parenteral (G3), e AH (1%) por via enteral (G4), avaliados no terceiro dia (M3d) e sétimo dia (M7d) após a confecção dos retalhos, ilustrando as fibras colágenas coradas em verde (Tricômio de Masson, 40x, barra de escala 20 μ m).

Discussão

O objetivo do estudo foi realizar a avaliação do AH exógeno derivado de fermentação bacteriana, considerado de alto peso molecular, por via enteral e parenteral em retalhos cutâneos isquêmicos em ratos, por meio dos exames clínico e histológicos; e avaliação dos biomarcadores pró e anti-inflamatórios teciduais. A hipótese foi alcançada parcialmente, visto que de acordo com os resultados, o AH (0,3%) administrado localmente demonstrou melhores efeitos benéficos com relação ao porcentual de necrose quando comparados com os demais grupos. O uso de substâncias com propriedades imunomoduladoras ou anti-inflamatórias em retalhos cutâneos tem por objetivo modular a inflamação exacerbada decorrente de eventos isquêmicos e/ou oxidativos e desse modo, evitar lesão tecidual e posteriormente necrose [1-3,23,24].

O estudo foi considerado inédito visto que a avaliação do AH exógeno em retalhos cutâneos isquêmicos, quer por via enteral ou parenteral, está ausente na literatura. Contudo, estudos relacionados com o uso do AH em feridas abertas e úlceras de córnea foram reportados por diferentes autores [7,10,12,25-28]. A relevância clínico-cirúrgica do presente estudo foi associada com as propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e estímulo da neovasculogênese do AH [8,13,14,29], podendo induzir efeitos benéficos na viabilidade dos retalhos cutâneos.

O modelo experimental de curta duração foi similar da literatura [1,3,30-33]. A metodologia de confecção dos retalhos isquêmicos foi procedida de acordo com Camargo et al. [22] (2014), onde esses autores observaram que o modelo induziu necrose em até 40% do retalho.

A concentração do AH exógeno usada por SC (0,3%) foi preconizada de acordo com os estudos *in vitro* de isquemia por reperfusão [34] e estudos *in vivo* em retalhos cutâneos isquêmicos de ratos [35]. A concentração do AH por via oral (1%) foi determinada pela dose e volume da capacidade gástrica dos ratos [36]. A administração enteral do AH foi realizada oito horas antes da confecção do retalho visto que a sua presença na pele de ratos foi identificada quatro horas após a sua administração [16], e o pico da biodisponibilidade foi de oito horas [19].

A temperatura retal se manteve nos limites de referência da espécie em todos os grupos durante todo o período do estudo. Esse fato pode ter indicado ausência de contaminação ou infecção nos retalhos [37]. Mesmo não tendo sido realizado exames microbiológicos, a ausência de contaminação foi correlacionada com a avaliação macroscópica dos retalhos, sendo que não foi observado quaisquer sinais clínicos associados à contaminação. Entretanto, foi observado uma diminuição significativa da massa corpórea em todos os grupos, entre o dia da indução dos retalhos e o M3d. Essa diminuição foi, possivelmente, decorrente do catabolismo associado a resposta inflamatória e ao estresse do procedimento cirúrgico [38].

A deiscência de suturas identificadas em todos os grupos, 24 horas após a indução dos retalhos, com maior incidência nos retalhos tratados com o AH e menor nos demais grupos, foi associada ao autotraumatismo observado durante o estudo. Contudo, essas deiscências não influenciaram na fixação dos retalhos. Segundo Huang et al. [1] (2019) e Feng et al. [3] (2020), a ampla extensão dos retalhos no dorso dos ratos, faz com que ocorra o acesso aos pontos de sutura, sendo considerado um ponto negativo em estudos com retalhos cutâneos dorsais. Os mesmos autores [1,3], recomendaram o uso de colar cervical para evitar o alcance dos ratos às suturas, e consequentemente autotraumatismo, porém, no presente estudo, optou-se por não usar o dispositivo, visto que poderia impedir a autolimpeza e induzir o estresse nos animais [39].

O início da necrose identificada 48 horas após à indução dos retalhos, e o aumento significativo do percentual de necrose até aos sete dias de avaliação, foi correlacionado com a possível isquemia persistente devido ao comprometimento vascular subdérmico [1,3,30-33,40-43].

Os animais tratados com o AH (1%) por via enteral apresentaram maior porcentagem de necrose no momento final do estudo quando comparados com os tratados com o AH (0,3%) por via parenteral. Esse fato foi associado com a possível fragmentação intestinal bacteriana que possa ter ocorrido nos animais, determinando menor concentração da substância nos retalhos [35]. Balogh et al. [16] (2008) identificaram a presença de AH radioativo na pele de ratos após quatro horas da administração oral do AH de alto peso molecular (1100 – 1500 kDa). Esse fato foi corroborado por Oe et al. [17] (2014) e Kimura

[19] et al. (2016), em ratos, quando se fez o uso do AH de diferentes pesos moleculares (300 e 920 kDa), na dose variando de 25 e 200 mg/kg.

Todos os grupos demonstraram um aumento dos valores das interleucinas inflamatórias, IL-1 β , IL-6 e FNT α , ao longo dos momentos avaliados, o que foi associado à lesão reperfusiva vascular que ocorre em retalhos isquêmicos, com a necrose mais pronunciada ao sétimo dia após a indução dos retalhos cutâneos [1,3,23]. Contudo, somente os animais tratados com solução salina (0,9%), demonstraram um aumento significativo das interleucinas, demonstrando os efeitos benéficos do AH. Paralelamente, o aumento dos valores dessas interleucinas, também, foi associado à realização ao trauma cirúrgico, visto que ocorre uma resposta inflamatória [38,44], porém, é necessária uma produção em equilíbrio [45-47]. A variação dos valores da interleucina anti-inflamatória IL-10 demonstrou uma possível limitação da resposta inflamatória exacerbada associada às IL-1 β , IL-6 e FNT α [45-49]. Shalom et al. [35] (2008), não identificaram diferenças significativas entre os ratos tratados com AH (1%) e com solução salina (0,9%), ambas as substâncias aplicadas no leito do retalho logo após o procedimento cirúrgico.

A epiderme é a camada cutânea que é mais acometida pelos eventos isquêmicos dos retalhos cutâneos, podendo ocasionar a epiteliólise e perda parcial do retalho [22,41,42]. Somente os retalhos tratados com solução salina (0,9%) e AH, ambos por via parenteral, ilustraram aumento significativo da espessura de epiderme ao longo dos momentos, entretanto, somente os animais tratados com o AH por via parenteral apresentaram valores significativamente maiores da espessura da epiderme quando comparados com os demais grupos. Esses resultados foram associados com o aumento do estímulo da queratinização e epitelização garantidos pelo AH [29].

A diminuição das células inflamatórias totais em todos os grupos, exceptuando os ratos tratados com AH por via parenteral, seguiu o mesmo padrão das interleucinas pró-inflamatórias. A metodologia de marcação celular na derme para avaliação das células inflamatórias totais foi essencial na correlação do perfil de mensuração tecidual local das interleucinas pró-inflamatórias, porém não tão específico. Iacopetti et al. [12] (2020) evidenciaram que a utilização tópica do AH em feridas estimulou mais folículos pilosos,

podendo interferir negativamente na mensuração de celularidade dos retalhos tratados com o AH por via parenteral.

A diminuição dos vasos sanguíneos na quantificação histológica foi similar à literatura [1,3,30,32,33,40-42]. Esses autores associaram essa diminuição com o dano vascular subdérmico. Salientou-se, que os retalhos tratados com o AH por via enteral, apresentou valor significativamente maior em relação aos submetidos à água destilada por via oral. Esses valores foram relacionados com o aumento das interleucinas pró-inflamatórias, podendo determinar a biodisponibilidade do AH na pele [17-19].

Na mensuração do colágeno total não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos e momentos avaliados. Contudo, o AH exógeno aumentou a produção de colágeno quando utilizado em cultivos de fibroblastos dérmicos [43] e na aplicação intradérmica [50,51]. Esse aumento foi decorrente do estímulo compressivo do AH sobre os fibroblastos [51]. A limitação do estudo incluiu ausência do exame imunoistoquímico para mensuração do fator de crescimento endotelial, podendo permitir a quantificação dos vasos sanguíneos de forma objetiva. Desse modo, existe a necessidade de incluir esse exame para estudos similares.

Conclusão

O AH em forma de hialuronato de sódio de alto peso molecular (1400 ~ 2000 kDa) demonstra efeitos benéficos quando usado por via enteral e parenteral em retalhos cutâneos isquêmicos de ratos. Contudo, o AH (0,3%) administrado por via parenteral no local do retalho logo após seu fechamento evidencia melhores resultados no percentual de necrose e no processo de epitelização.

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 Bérghamo D, Luísa Bérghamo 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.

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 Cenyrat, 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

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2176 - patrizia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br