

Estado da publicação: Não informado pelo autor submissor

AVALIAÇÃO DO OMENTO COMO DOADOR DE CÉLULAS TRONCO NO MIOCÁRDIO ISQUÊMICO ATRAVÉS DA ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DO CD34

Fernando Bermudez Kubrusly, Luiz Fernando Kubrusly, Fernando Issamu Tabushi, Douglas Mesadri Gewehr, Allan Fernando Giovanini, Carlos Cesar Bof Bufon, Ana Maria Waaga-Gasser, Osvaldo Malafaia

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.4790>

Submetido em: 2022-09-26

Postado em: 2022-09-27 (versão 1)

(AAAA-MM-DD)

AVALIAÇÃO DO OMENTO COMO DOADOR DE CÉLULAS TRONCO NO MIOCÁRDIO ISQUÊMICO ATRAVÉS DA ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DO CD34

EVALUATION OF THE OMENTUM AS A STEM CELL DONOR ISCHEMIC MYOCARDIAL THROUGH CD34 IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS

Fernando Bermudez **KUBRUSLY**¹, Luiz Fernando **KUBRUSLY**¹, Fernando Issamu **TABUSHI**¹, Douglas Mesadri **GEWEHR**¹, Allan Fernando **GIOVANINI**¹, Carlos Cesar Bof **BUFON**¹, Ana Maria **WAAGA-GASSER**², Osvaldo **MALAFAIA**¹,

Trabalho realizado na ¹Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, PR, Brasil; ²Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA.

ORCID

Fernando Bermudez Kubrusly - <https://orcid.org/0000-0002-5045-9237>

Luiz Fernando Kubrusly - <https://orcid.org/0000-0002-6546-9841>

Fernando Issamu Tabushi - <https://orcid.org/0000-0002-3150-2164>

Douglas Mesadri Gewehr - <https://orcid.org/0000-0001-9393-2445>

Allan Fernando Giovanini - <https://orcid.org/0000-0002-1637-2955>

Carlos Cesar Bof Bufon - <https://orcid.org/0000-0002-1493-8118>

Ana Maria Waaga-Gasser - <https://orcid.org/0000-0002-5587-5256>

Osvaldo Malafaia - <https://orcid.org/0000-0002-1829-7071>

Correspondência:

Fernando Bermudez Kubrusly

Email: kubrusly.f@gmail.com

Conflito de interesse: Nenhum

Financiamento: Em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001

Contribuição dos autores:

Fernando Bermudez Kubrusly: Conceituação, Curadoria de dados, Análise formal.

Luiz Fernando Kubrusly: Metodologia

Fernando Issamu tabushi: Análise crítica e correção

Douglas Mesadri Gewehr - Investigação

Allan Fernando Giovanini - Conceituação

Carlos Cesar Bof Bufon - Análise formal

Ana Maria Waaga-Gasser - Supervisão

Osvaldo Malafaia: Administração do projeto

RESUMO – Racional: As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo. O uso de células precursoras hematopoiéticas e os recentes progressos feitos na bioengenharia de enxertos cardíacos oferecem uma nova modalidade terapêutica para a regeneração do tecido cardíaco pós-infarto do miocárdio (IM). O CD34 é um marcador expresso em todas as células precursoras hematopoiéticas e endoteliais, e funciona como fator de adesão celular. O anticorpo que correspondente

a este marcador é utilizado na imunohistoquímica para avaliar a formação de novos vasos e a presença de células-tronco. **Objetivo:** O estudo teve por objetivo avaliar a eficácia da omentopexia na neovascularização e na doação de células tronco de corações suínos previamente infartados, a partir da análise imunohistoquímica do CD34. **Método:** O infarto do miocárdio foi gerado em 4 suínos, por ligadura do 1º e 2º ramos marginais da artéria circunflexa. Em 3 animais realizou-se abrasão cuidadosa do epicárdio infartado seguido de múltiplas perfurações miocárdicas e a mobilização do omento da cavidade abdominal para o mediastino, envolvendo a área infartada e as perfurações. No quarto animal não foi realizado a omentopexia sendo realizado apenas a abrasão e perfuração da área infartada. Todos os animais foram eutanasiados ao 30º dia pós operatório e os corações retirados para avaliação macroscópica, microscópica e Imunohistoquímica do CD34. **Resultados:** Nas amostras do grupo submetido a omentopexia, ocorreu um aumento de 60% da angiogênese, sendo que nas amostras do animal controle houve marcação mínima. Foram avaliadas quatro amostras de diferentes sítios de cada coração dos animais, totalizando 16 amostras histopatológicas. Todas as amostras foram imunomarcadas para CD-34. **Conclusões:** O omento mostrou-se eficiente na indução de neovascularização pela presença de células tronco, vista através da marcação do CD34, demonstrando grande potencial como futura terapêutica para restaurar áreas de miocárdio isquêmico.

DESCRITORES: isquemia miocárdica, revascularização miocárdica, omentopexia, imunohistoquímica, CD34, células tronco

ABSTRACT

ABSTRACT - Background: Cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world. The use of hematopoietic precursor cells and recent advances made in heart graft bioengineering offer a new therapeutic modality for post-myocardial infarction (MI) and cardiac tissue regeneration. CD34 is a marker expressed on all hematopoietic and endothelial precursor cells, and functions as a cell adhesion factor. The antibody corresponding to this marker is used in immunohistochemistry to assess the formation of new vessels and the presence of stem cells. **Aim:** To evaluate the efficacy of omentopexy as stem cell donor, on previously infarcted myocardium, using immunohistochemically analysis of CD34. **Method:** Myocardial infarction was generated in four pigs, by ligation of the 1st and 2nd marginal branches of the circumflex artery. In three animals, abrasion of the infarcted epicardium was performed followed by multiple myocardial perforations and the mobilization of the omentum from the abdominal cavity to the mediastinum, sutured on the infarcted area. In the fourth animal, omentopexy was not performed and only the abrasion and perforation of the infarcted area were performed. All hearts were removed for CD34 immunohistochemically evaluation. **Results:** In the samples from the group submitted to omentopexy, there was a 60% increase in angiogenesis, and in the samples from the control animal there was minimal staining. Four samples from different sites of each animal, totaling 16 histopathological samples were evaluated. All samples were immunolabelled for CD34. **Conclusions:** Omentopexy proved to be effective in seeding previously infarcted myocardium with stem angiogenic cells, seen through immunohistochemistry, using CD34 marker.

KEYWORDS: stem cell, myocardial ischemia, myocardial revascularization, omentopexy, immunohistochemistry, CD34.

INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo atualmente, levando a taxas alarmantes de mortalidade em diversas populações. Segundo dados do Sistema Único de Saúde (DATASUS) e Sociedade Brasileira de Cardiologia estima-se que 127.513 pessoas faleceram no país em 2018 devido a doenças isquêmicas do coração de um total de 395.700 mortes por causas cardiovasculares no mesmo ano (Cardiômetro).

Em 2017, 379.133 mortes foram registradas por morte súbita cardíaca nos Estados Unidos da América, o que representa 13,5% do total de mortes no país, ou seja 1 a cada 7,4 mortes de americanos nesse período (Cardiômetro - SBC).

Já no mundo, em 2017, houve aproximadamente 8.930.000 mortes, por doenças isquêmicas do coração, de um total próximo a 17.800.000 por causas cardiovasculares, sendo que estas tiveram um aumento de 21,1% em relação a 2007 (ROTH et al., 2018; VIRANI et al., 2020).

As primeiras alterações estruturais observadas ocorrem 10 a 15 minutos após o início da isquemia, sendo observados glicogênio celular diminuído, miofibrilas relaxadas e ruptura de sarcômeros. Anormalidades mitocondriais são geralmente observadas 10 minutos após a oclusão coronariana e ocorrem de maneira progressiva, podendo ser observadas na microscopia eletrônica.

Pode-se levar horas até que seja possível a detecção da necrose miocárdica em humanos, diferentemente do que ocorre em animais, onde já se é possível identificar a apoptose celular em até 10 minutos após a indução de isquemia. Baseado em estudos experimentais, a necrose progride do subendocárdio para o subepicárdio ao longo de várias horas. Esse tempo pode ser aumentado pela presença de fluxo colateral existente, redução do consumo de oxigênio pelo miocárdio e a presença de intermitência entre oclusão e reperfusão. A implementação oportuna de terapias de reperfusão é capaz de reduzir a extensão da lesão isquêmica no miocárdio (THYGESEN et al., 2018).

O infarto do miocárdio pode ser classificado de acordo com sua etiologia, transmuralidade e tempo de evolução.

Quanto à etiologia, pode ser do tipo I que corresponde ao infarto espontâneo relacionado a isquemia devido a um evento coronariano primário como erosão, com ou sem ruptura, ou fissura ou dissecação de uma placa aterosclerótica. Pode ser do tipo 2, infarto do miocárdio secundário a isquemia devido a um aumento na demanda de oxigênio ou uma diminuição na oferta do mesmo. Como causas pode-se citar o espasmo coronariano, embolismo coronariano, anemia, arritmias, hipertensão ou hipotensão. O tipo 3, morte súbita de origem cardíaca, geralmente com sintomas sugestivos de isquemia miocárdica, mas morte ocorrendo antes de se obter amostras sanguíneas, ou pouco tempo antes dos biomarcadores positivarem no sangue. O tipo 4, infarto do miocárdio associado à intervenção coronariana percutânea (4a) ou trombose de *stent* (4b) ou, ainda, estenose pós intervenção coronariana (4c) e o tipo 5, infarto do miocárdio associado a cirurgia de revascularização do miocárdio (CHAPMAN; ADAMSON; MILLS, 2017; THYGESEN et al., 2018).

Quanto a transmuralidade o infarto do miocárdio pode ser subendocárdico que corresponde à uma isquemia que envolve apenas uma camada subendocárdica, menor do que 50% da espessura da área afetada do miocárdio ou transmural com sofrimento isquêmico comprometendo pelo menos 50% da espessura da área afetada do miocárdio (PETRIZ et al., 2014).

Quanto ao tempo de evolução pode ser superagudo (< 6 horas), agudo (6 horas a 7 dias), em cicatrização (7-28 dias); cicatrizado (\geq 29 dias) (THYGESEN et al., 2018).

Após o infarto do miocárdio se houver um longo tempo de isquemia é possível que mais de 1 bilhão de células percam sua vitalidade e viabilidade em resposta a essa agressão. O coração mamífero tem uma capacidade variável de regeneração após sofrer uma lesão isquêmica por um tempo extenso, podendo variar de uma resposta adequada à cicatrização da lesão até um processo onde as células perdidas são substituídas por um tecido fibrótico seguido por um remodelamento cardíaco adverso que evolui com prejuízo na função sistólica (MOUTON; RIVERA; LINDSEY, 2018; TALMAN; RUSKOAHO, 2016).

A fibrose cardíaca é dividida em duas após a ocorrência do infarto, a fibrose de restauração e a fibrose reativa. A fibrose de restauração é a que ocorre num primeiro momento, para impedir a ruptura da câmara cardíaca. No entanto, o estresse mecânico junto com uma resposta hormonal parácrina leva à expansão dessa fibrose em áreas remotas à área do infarto, sendo essa uma fibrose reativa. Essa fibrose reativa leva à uma alteração na complacência da câmara cardíaca e um aumento na rigidez ventricular comprometendo a contratilidade e a função sistólica. Toda essa área de fibrose pode ainda levar a anormalidades da condução elétrica cardíaca, predispondo a arritmias de reentrada, como a taquicardia ventricular sustentada, bloqueios de ramos, entre outros distúrbios elétricos, que contribuem para o risco de morte súbita nesses pacientes (FRANGOGIANNIS, 2015; TALMAN; RUSKOAHO, 2016).

Nas últimas duas décadas dois métodos se destacaram na obtenção da revascularização do miocárdio pós-infarto: a intervenção coronariana percutânea e a cirurgia de revascularização do miocárdio. A primeira tem se firmado como uma boa alternativa em pacientes que se apresentam agudamente, principalmente com supradesnivelamento do segmento ST, com anatomia favorável e alguns pacientes não-diabéticos com múltiplas lesões, mas com anatomia favorável. A segunda, por sua vez, tem sido preferência nos casos de múltiplos vasos acometidos ou danos extensos, além de lesões de tronco de coronária esquerda, pacientes com anatomia desfavorável, ou pacientes com diabetes *melitus* e múltiplas artérias acometidas, a não ser que haja um comprometimento por outras comorbidades, risco cirúrgico alto ou pequena expectativa de sobrevida pós-procedimento (NEUMANN et al., 2019; RUEL et al., 2018).

Nesse contexto, a neovascularização de áreas isquêmicas cardíacas torna-se decisiva para o aumento da sobrevida do paciente e, tanto a angiogênese como a circulação de células progenitoras endoteliais (CPEs), durante a vasculogênese, seriam essenciais para a avaliação da resposta à isquemia, visto que existem evidências crescentes de que a mobilização maior de CPEs aumenta a neovascularização do tecido isquêmico e pode ser clinicamente relevante no cenário da isquemia tecidual (TSAI et al., 2012).

Tem-se observado que o omento é uma extraordinária fonte de fatores angiogênicos como VEGF e FGF- β . Especificamente, as células CD34 positivas do omento humano podem ser as responsáveis por promover angiogênese e sintetizar fatores de crescimento que facilitam a revascularização do tecido acometido (DI NICOLA, 2019). O omento tem sido usado como suporte nos desafios da regeneração miocárdica, superando a deficiência de vascularização e favorecendo a enxertia de tecidos de bioengenharia. Suas propriedades regenerativas têm sido exploradas em técnicas cirúrgicas, como a transposição omental, onde o tecido é estendido ou envolvido pelo omento para promover cicatrização, como ocorre na técnica da cardio-omentopexia (WANG; ROCHE; GENTILE, 2020).

Os tecidos de bioengenharia cardíaca incluem uma variedade de abordagens, em que podem-se usar células musculares esqueléticas, células derivadas do próprio omento, tecido atrial, tecido hepático, tecido uterino e células-tronco. A técnica da omentopexia favorece a enxertia dessas células (WANG; ROCHE; GENTILE, 2020; WANG et al., 2019).

Em uma revisão sistemática Wang et al. reportaram 17 ensaios clínicos onde com a omentopexia cardíaca foram encontrados uma maior densidade de vasos arteriolares e capilares, aumento de marcadores angiogênicos, aumento no fluxo sanguíneo, diminuição no remodelamento cardíaco e melhora na função ventricular. No entanto eles alertam a necessidade de mais estudos para se compreender os mecanismos desses eventos e sua aplicabilidade clínica (WANG; ROCHE; GENTILE, 2020).

Portanto, considerando a possibilidade da transferência de células tronco totipotentes para um miocárdio isquêmico ou necrótico o objetivo deste estudo é avaliar a eficácia da omentopexia como doadora de células progenitoras endoteliais em miocárdio previamente infartado, por meio de análise imunohistoquímica da presença do CD34.

MÉTODOS

ASPECTOS ÉTICOS

Todos os protocolos experimentais foram realizados em conformidade com as normas estabelecidas no “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th edition”, com as Normas Brasileiras para a Prática Didático-Científico da Vivisseção, Lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, que regulamentam os procedimentos submetidos à pesquisa científica e a resolução nº 714 de 20 de julho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) que regula os procedimentos de eutanásia, além dos Princípios Éticos na Experimentação Animal do Conselho Nacional do Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Foram obedecidas, também, as normas estabelecidas no “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1996). Os animais utilizados neste estudo experimental foram fornecidos pelo Biotério da Labcor em Belo Horizonte e Nova Lima -MG. Esse estudo também tem aprovação do Comitê de Ética do laboratório experimental da Labcor.

Os animais utilizados neste estudo experimental foram fornecidos pelo Biotério da Labcor em Belo Horizonte e Nova Lima -MG

Os custos referentes a aquisição dos animais e sua manutenção, aos procedimentos cirúrgicos, ao pós operatório dos animais e ao estudo imunohistoquímico foram subsidiados pelo Instituto Denton Cooley de Pesquisa, Ciência e Tecnologia (IDC) e pelo Instituto do Coração de Curitiba (INCOR Curitiba), e pela Labcor.

ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados para o experimento 4 (quatro) suínos, machos, da raça Landrace (*Sus scrofa domesticus*), com aproximadamente 8 semanas, com peso variando entre 20 e 25 kg. A quantia de animais utilizadas (nosso n) foi ditada pela comissão de ética em uso de animais do biotério Labcor. Foram incluídos no estudo apenas animais considerados hígidos de acordo com a avaliação clínica e laboratorial prévia. Os animais foram alojados de acordo com os padrões de criação sanitários convencionais, em gaiolas unitárias, ambiente silencioso, temperatura entre 20º e

28°C, com água *ad libitum* e alimentados com ração comercial padrão, sem suplementação lipídica adicional, balanceada e adaptada para a idade.

Os animais foram divididos em 2 grupos:

- Grupo Teste (n = 3): animais submetidos a indução do infarto agudo do miocárdio com a realização da cardio-omentopexia.
- Grupo Controle (n = 1): animal submetido apenas a indução do infarto agudo do miocárdio com abrasão epicárdica e perfurações miocárdicas, sem a realização da cardio-omentopexia.

PROTOCOLO ANESTÉSICO E ANALGÉSICO

Preparo Pré-Operatório

Foi instituído um jejum de metade da quantidade de ração ofertada aos animais, 48 horas antes do procedimento cirúrgico e, a partir de 24 horas pré procedimento, jejum total para sólidos. A água foi mantida à vontade até 12 horas antes da cirurgia.

Indução Anestésica, Intubação e Manutenção Anestésica

Os animais foram pré-medicados com a associação de acepromazina 0,05 mg/kg, cetamina 10 mg/kg e midazolam 0,5 mg/kg, administrados pela via intramuscular em região cervical através de um scalpe 21G. Posteriormente, os animais foram posicionados em mesa cirúrgica em decúbito ventral e um acesso periférico foi obtido com a punção da veia auricular com cateter tipo Jelco® 20G. Procedeu-se a indução anestésica com tiopental 12,5 mg/kg por via intravenosa, sob infusão lenta e contínua, seguido de intubação orotraqueal com cânula 7,5 Fr e mantido em ventilação assistida e manutenção anestésica com isoflurano na concentração de 1,5 %

Analgesia intra-operatória e pós-operatória

Durante o período intraoperatório, o controle analgésico foi realizado através da infusão intravenosa contínua de 30 mg de morfina associado à 30 mg de cetamina e 150 mg de lidocaína em bomba de infusão de 10 ml/kg/hr (solução fisiológica). Durante o pós-operatório imediato, o animal foi mantido com de cloridrato de tramadol 7 mg/kg IM, a cada 8 horas, associado a cetoprofeno 1 mg/kg IM a cada 24 horas.

MONITORIZAÇÃO TRANSOPERATÓRIA

A monitorização transoperatória foi realizada com monitorização cardíaca com monitor 6 canais, Pressão Venosa Central e da Pressão arterial Media Invasiva. Os dados eram visualizados e gravados com os respectivos tempos operatórios

INDUÇÃO CIRÚRGICA DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

Preparação do Animal e Início do Procedimento Cirúrgico

Após a indução anestésica, o animal foi posicionado em decúbito lateral direito, conduzida a tricotomia da região subcostal até a região axilar e escapular à esquerda, com o objetivo de manter a região em torno da incisão cutânea limpa, reduzir a possibilidade de infecção e facilitar a troca dos curativos. Na sequência foi realizada

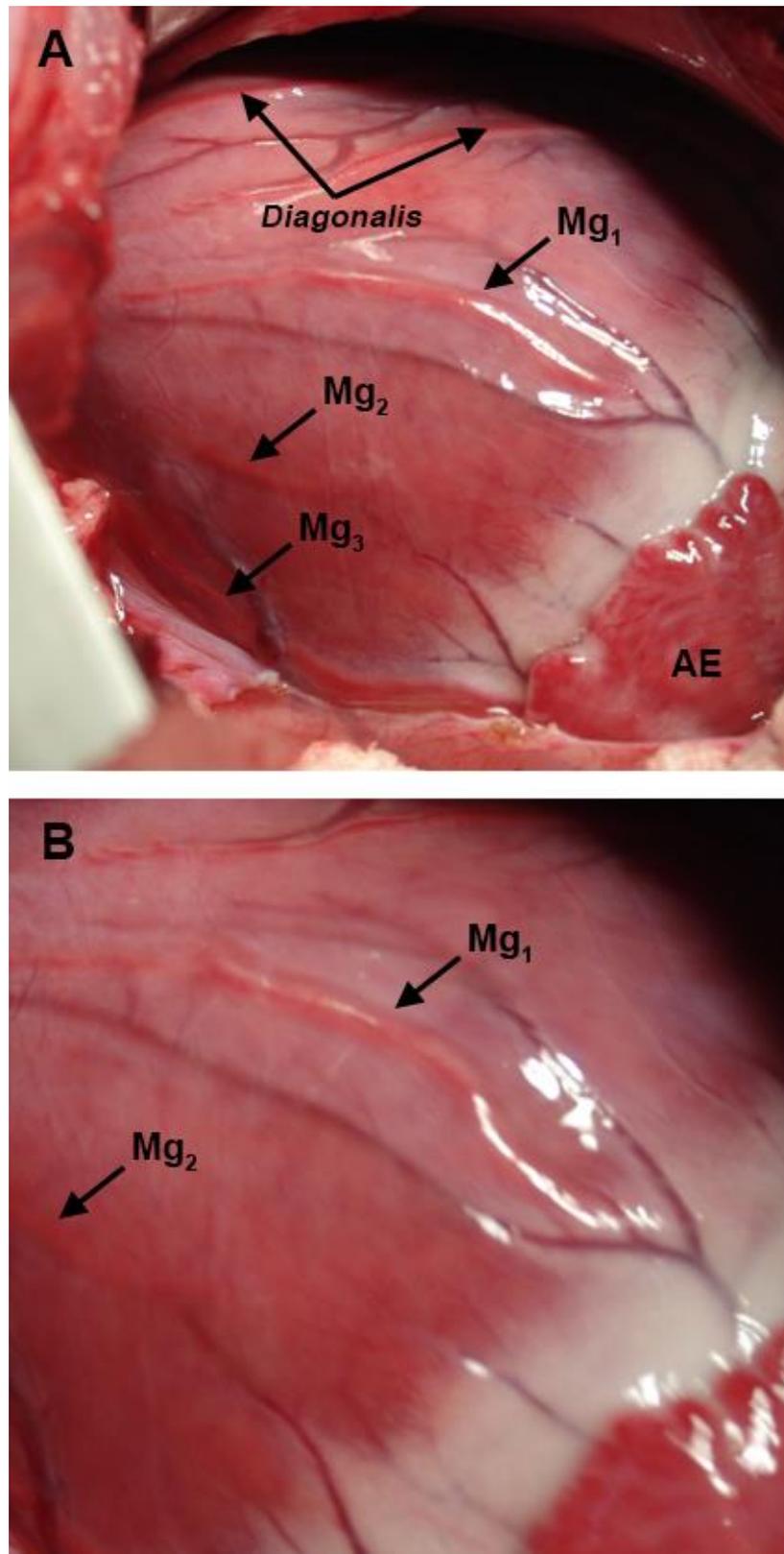
a desinfecção cutânea do sítio operatório com polivinilpirrolidona iodada (PVPI) e a colocação de campos operatórios estéreis, expondo apenas a área da incisão cutânea. A técnica asséptica foi mantida durante todo o ato operatório e, a temperatura corporal do animal, mantida com manta térmica.

Toracotomia Esquerda e Ligadura Coronariana

Foi conduzida a toracotomia póstero-lateral esquerda através de uma incisão de 25 – 30 cm de extensão, na altura do 4º espaço intercostal esquerdo. A pele foi separada do músculo latíssimo do dorso e das fibras do músculo serrátil anterior utilizando uma tesoura *Metzenbaum*, objetivando a dissecação sem corte ao longo da incisão. Uma vez expostos as costelas e os músculos intercostais, estes foram incisados com a tesoura de *Metzenbaum*, com o cuidado de permanecer ao longo da borda superior da costela para evitar o feixe neurovascular. O espaço pleural foi penetrado de forma rápida e gentil durante a expiração, com o objetivo de evitar injúria pulmonar, e então posicionado o afastador de *Finochietto* pediátrico, objetivando afastar as bordas costais e manter a exposição cirúrgica. O pulmão esquerdo foi cuidadosamente afastado do pericárdio com uma pequena esponja. Após a exposição do saco pericárdico, foi realizada a pericardiotomia mediana, estendendo-se do ápice à base do coração, abaixo do nervo frênico.

Após a exposição do epicárdio, foram identificados (Figura 1) e ligados os primeiros 2 ramos marginais (1º e 2º ramo) da artéria circunflexa, utilizando fio polipropileno 5-0 (Prolene®; Ethicon GmbH, Hamburg, Germany), à distância de 40% de sua origem (Figura 2) (RABBANI; AHMADI; FAYAZZADEH, 2006). Em todos os animais, a realização bem-sucedida do infarto agudo do miocárdio foi verificada pela observação da elevação persistente do segmento ST no traçado eletrocardiográfico intraoperatório e a alteração de coloração da superfície epicárdica de vermelho-rosado para pálido. Foi empregado um protocolo antiarrítmico descrito por Millner et al. (1991), com o objetivo de prevenir arritmias graves. Esta metodologia consiste na administração de lidocaína 0,2% IV, 100 mg em *bolus* lento durante a pericardiotomia e 50 mg em *bolus* lento 20 minutos após a ligadura coronariana.

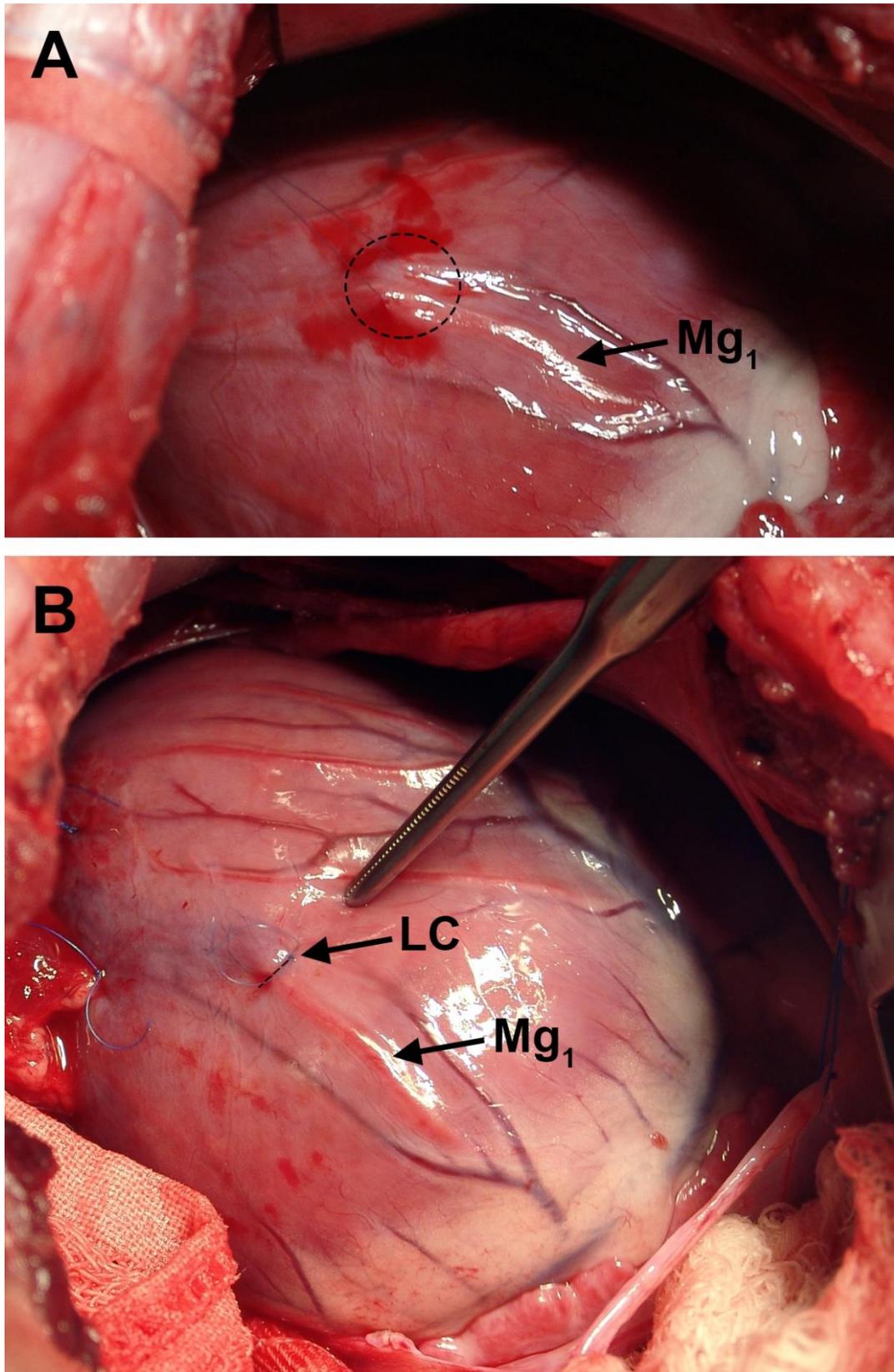
Figura 1 – Identificação dos Ramos Marginais da Artéria Circunflexa



Fonte: o autor (2020)

Legenda: A. Aspecto da exposição dos vasos epicárdicos da face póstero-lateral do ventrículo esquerdo, após a realização da toracotomia esquerda e pericardiotomia. B. Imagem ampliada para a identificação do 1º e 2º ramo marginal da coronária esquerda percorrendo a superfície epicárdica da parede póstero-lateral do ventrículo esquerdo. AE, átrio esquerdo; Mg, ramo marginal.

Figura 2 – Ligadura do 1º e 2º Ramos Marginais da Artéria Circunflexa



Fonte: o autor (2020)

Legenda: A. Primeiro ramo marginal (Mg₁) da artéria circunflexa rodeado com fio de polipropileno 5-0 (Prolene®) (círculo tracejado). B. Aspecto final da ligadura coronariana (LC) do 1º ramo marginal (Mg₁) em seu terço médio.

Fechamento da Parede Torácica

Os bordos da toracotomia esquerda foram aproximados com sutura contínua simples com poliglactina 2-0 (VICRYL®; Ethicon Inc, USA). Antes do fechamento do último ponto, o máximo do ar foi expulso da cavidade torácica através de inspiração profunda mecanicamente assistida. Foi posicionado um dreno torácico com selo de água para a retirada do ar residual nas 24 horas subseqüentes à cirurgia. O tecido celular subcutâneo e a pele foram suturados separadamente, através de pontos simples, com fio de polipropileno 2-0 (Prolene®; Ethicon GmbH, Hamburg, Germany).

TÉCNICA CIRÚRGICA DA CARDIO-OMENTOPEXIA

Logo antes da realização da toracotomia lateral, a cavidade abdominal foi acessada através de uma laparotomia paramediana esquerda. O grande omento foi visualizado e conduzida sua separação do colón transverso. O cólon foi segurado e tracionado caudalmente com pinça atraumática e a separação da dissecção foi realizada no plano anatômico avascular. A artéria gastroepiplóica direita (AGED) (suprimento sanguíneo dominante) foi deixada intocada, sendo possível confeccionar um retalho omental pediculado (ROP) às custas da AGED e da arcada de Barkow, dividindo apenas algumas anastomoses entre as artérias gastroepiplóicas. A transposição torácica do ROP foi alcançada por meio de uma incisão de 5 cm na região subesternal do diafragma (PUMA et al., 2003).

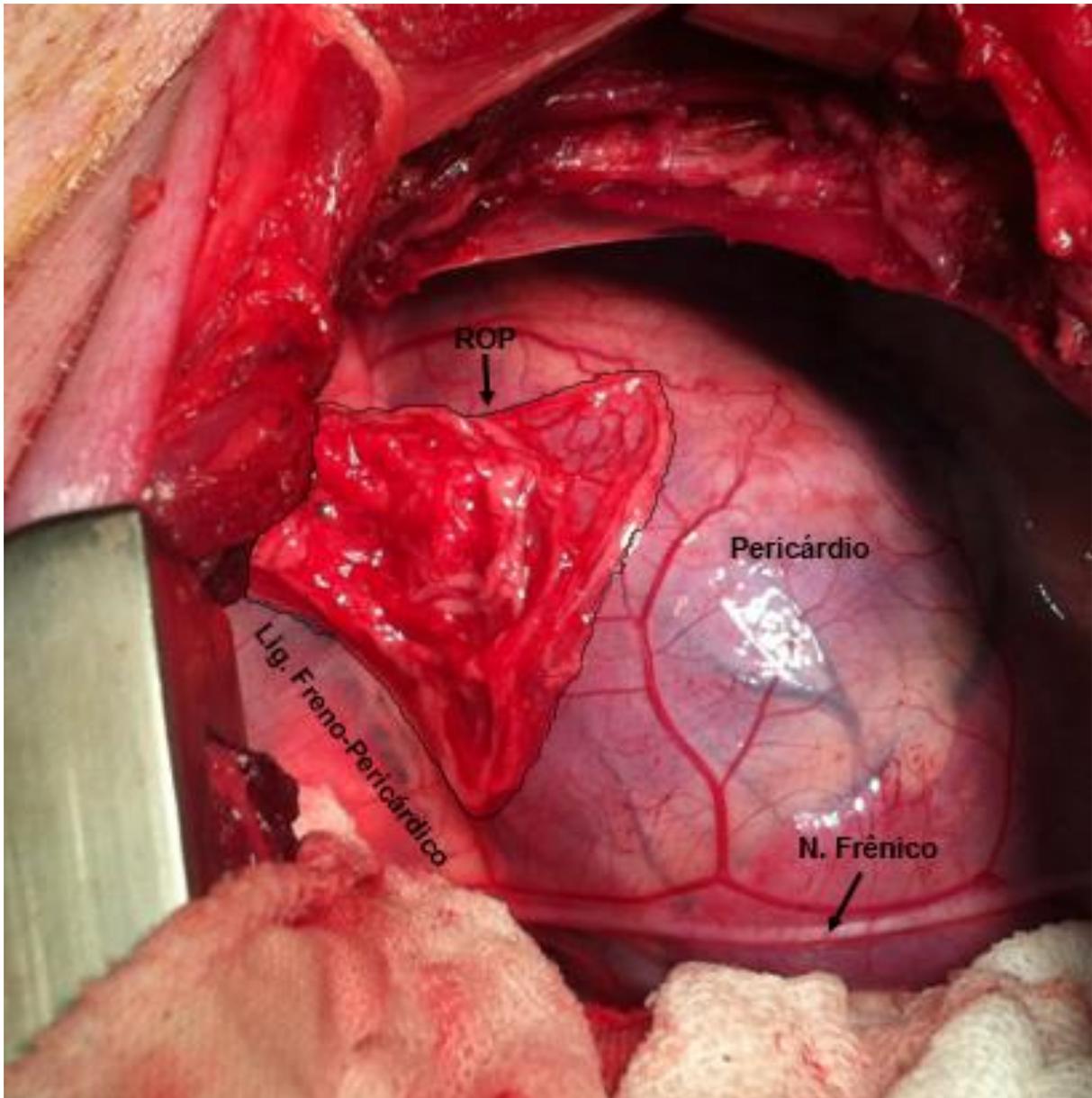
A condução do ROP sucedeu-se de forma cautelosa, utilizando uma pinça Duval, para evitar o estiramento da grande curvatura do estômago cranialmente e, por fim, transposto sobre a área miocárdica infartada. Noventa minutos após a ligadura dos ramos marginais da artéria circunflexa e da estabilização hemodinâmica dos animais, foi conduzida a abrasão epicárdica cuidadosa (utilizando lâmina de bisturi n. 15) seguida de múltiplas perfurações miocárdicas na topografia referente ao infarto agudo do miocárdio (OLIVEIRA et al., 1999).

A sutura do ROP sobre o leito receptor foi realizada com pontos simples de Prolene 5-0 sobre as margens da área infartada, distanciando-se 1,5 cm entre as suturas. Nenhum dreno abdominal foi utilizado. Após a revisão da hemostasia da cavidade, procedeu-se a síntese do plano musculo-aponeurótico da parede abdominal com sutura contínua de poliglactina 0 (VICRYL®; Ethicon Inc, USA). O tecido celular subcutâneo e a pele foram suturados separadamente, através de pontos simples de Nylon 3-0.

Antibioticoprofilaxia

A antibioticoterapia de escolha foi o cloridrato de ceftiofur na dose de 30 mg/kg, a cada 12 horas, durante 5 dias.

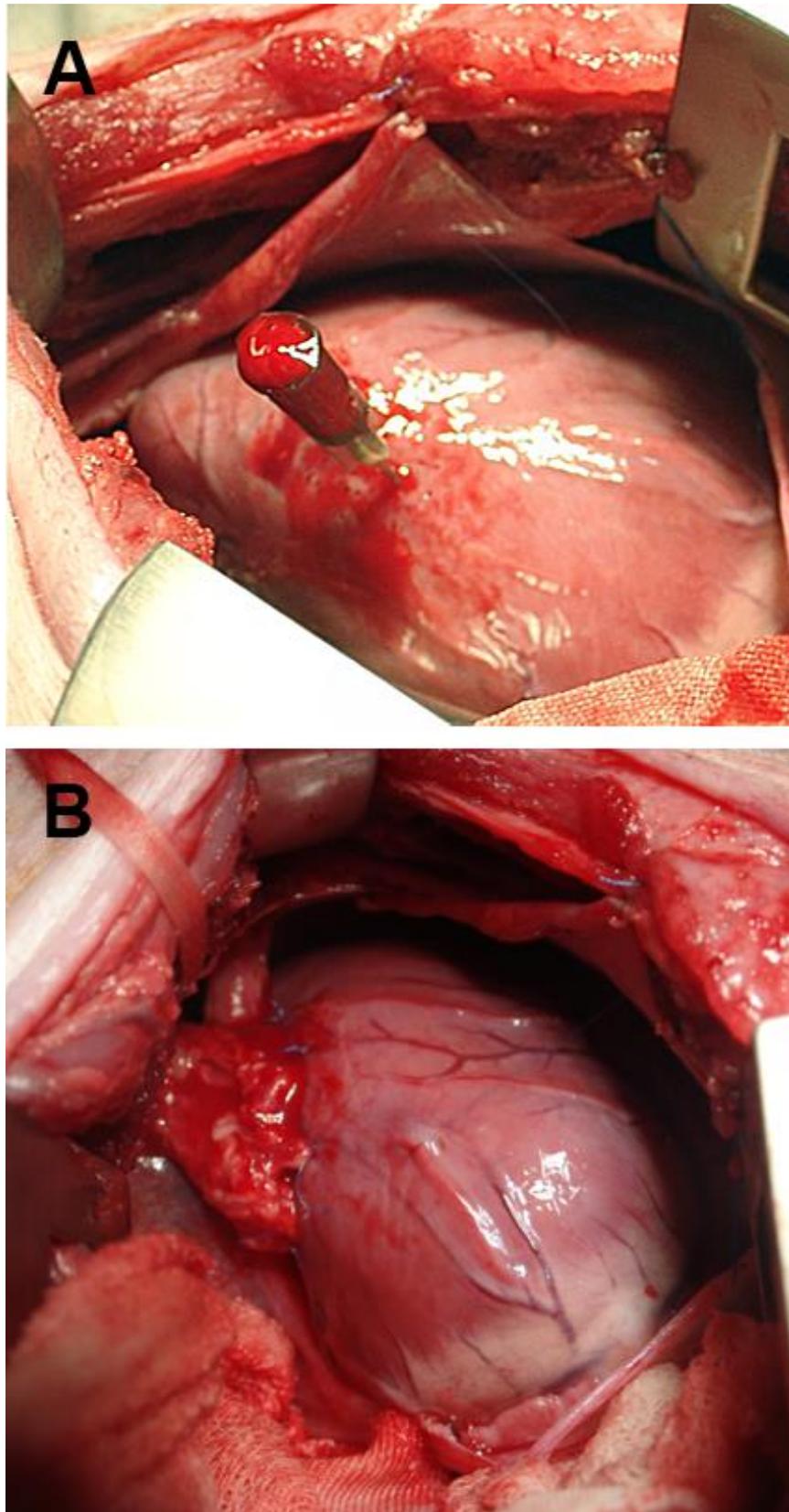
Figura 3 – Medição do Retalho Omental Pediculado



Fonte: o autor (2020).

Legenda: Transposição torácica do retalho omental pediculado e seu posicionamento sobre a superfície pericárdica, para medição e acomodamento do retalho, antes da realização da pericardiotomia. Lig., ligamento; N., nervo; ROP, retalho omental pediculado.

Figura 4 – Abrasão miocárdica e fixação do retalho omental pediculado



Fonte: o autor (2020).

Legenda: A. Múltiplas perfurações da superfície epicárdica. B. Fixação do retalho omental pediculado sobre a superfície epicárdica referente ao infarto agudo do miocárdio, após a realização da abrasão miocárdica.

CUIDADOS PÓS OPERATÓRIOS

As feridas cirúrgicas foram higienizadas com solução fisiológica estéril, secadas e aplicado oxitetraciclina com hidrocortisona spray (Terra-Cortril® Spray; Zoetis, Araçoiaba da Serra, Brasil), uma vez ao dia, até a total cicatrização.

Método da Eutanásia

A eutanásia foi efetuada através de overdose anestésica com tiopental 50 mg/kg por via intravenosa, respeitando os princípios éticos da experimentação animal preconizados pelas normativas do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). A eutanásia foi realizada 30 dias após a indução do infarto agudo do miocárdio e os corações foram retirados respeitando-se a área de omentopexia

PREPARO DAS AMOSTRAS PARA A HISTOPATOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA

No dia da eutanásia, a comunicação entre as coronárias e os ramos da artéria Gastroepiplóica Direita foi avaliada com a instilação de uma solução contendo partículas de carvão vegetal. Após a entubação, a laparotomias foi refeita tomando-se cuidado para não lesar o omento. Um cateter venoso 24 mm foi inserido na artéria Celiaca até alcançar a artéria Gastroepiplóica direita e então foi fixado. O tórax foi reaberto para expor o coração envolvido pelo omento. Os animais foram eutanasiados (conforme descrito previamente), o coração e o omento foram removidos em bloco. Solução fisiológica 0,9% (60ml) heparinizada foi infundida lentamente pelo cateter fixado na artéria 20 gastroepiplóica Direita para a lavagem dos vasos. Em seguida, foram infundidos 30 ml de Solução Fisiológica 0,9% com suspensão de micropartículas de carvão vegetal.

Após a eutanásia, o coração foi coletado, lavado e fixado em solução de formaldeído tamponado neutro 10%. Após a fixação, realizou-se a coleta de 4 amostras da região de miocárdio infartado e da cardio-omentopexia, em locais diferentes de cada animal, selecionadas de forma randomizada, totalizando 16 amostras histopatológicas. O material foi incluído em blocos de parafina e foram realizados cortes histológicos em micrótomo semiautomático (4 µm). As amostras foram coradas com hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson, para posterior realização do estudo imunohistoquímico.

ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO

O método para obtenção da coloração imunohistoquímica dos cortes parafinados e a expressão dos marcadores estudados foi realizado utilizando o protocolo da CITOLAB - Laboratório de Citologia e Histopatologia Ltda., de Curitiba.

Todas as lâminas foram tratadas imunohistoquimicamente, seguindo protocolo do CITOLAB, e conservadas exatamente da mesma forma. O preparo incluiu duas etapas em dois dias. A primeira foi a desparafinização seguida de recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena e incubação das lâminas com anticorpo primário por toda a noite. No segundo dia, foi realizada a etapa seguinte com a incubação do anticorpo secundário (biotina) por 30 minutos (cor amarela) e após banho em solução tampão a incubação com streptovidina por mais 30 minutos (cor vermelha). A seguir, a lâmina recebeu a diaminobenzidina - DAB, que é um cromógeno, ou seja, substância

que após ligar-se a streptavidina, na árvore da reação confere a coloração acastanhada. A streptavidina permanece ligada a biotina (anticorpo secundário), que por sua vez fica ligada ao primário. Esta reação fornece as cores a serem estudadas pelo sistema computadorizado, faz-se ainda nova coloração com hematoxilina para fazer contraste com o fundo da lâmina, melhorando assim a visualização. Só então se prepara a montagem final delas para leitura pelos patologistas, com sua identificação e etiquetagem.

Neste estudo, foi utilizado o marcador para CD34, que através de reação imunológica com anticorpo específico identifica a angiogênese. O anticorpo anti-CD34 utilizado foi do tipo IgG, derivado de plasma de rato na concentração de 200 µ/ml (clone QBEnd/10 LAB – VISION).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise das lâminas foi examinador dependente com pessoa treinada e baseou-se na intensidade do imunomarcador para determinar o escore em cruzes. Além disso, utilizou-se o software ImageJ 1.46r (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) para avaliação quantitativa das áreas marcadas

RESULTADOS

ACHADOS MACROSCÓPICOS

Após 30 dias, com o coração já fixado em formaldeído tamponado neutro 10%, foram realizados cortes transversais do ápice à base cardíaca, com objetivo de expor toda a extensão das paredes dos ventrículos cardíacos. As paredes cardíacas estavam espessadas e enrijecidas, tendo o miocárdio uma coloração castanho-amarelada e aspecto mosqueado. Presença de área irregular, adelgada e deprimida na parede póstero-inferior do ventrículo esquerdo, de coloração pálida, correspondente a área de fibrose miocárdica no grupo sem cardio-omentopexia (Figura 5). Já no grupo de animais submetidos a cardio-omentopexia, observa-se o omento maior aderido à parede póstero-inferior do ventrículo esquerdo, com manutenção parcial da espessura miocárdica (Figura 6).

Figura 5 – Aspecto macroscópico transversal do coração do animal não submetido a cardio-omentopexia



Fonte: o autor (2020).

Legenda: setas indicando o afilamento do miocárdio.

Figura 6 – Aspecto macroscópico transversal do coração dos animais submetidos a cardio-omentopexia – espessura miocárdica preservada

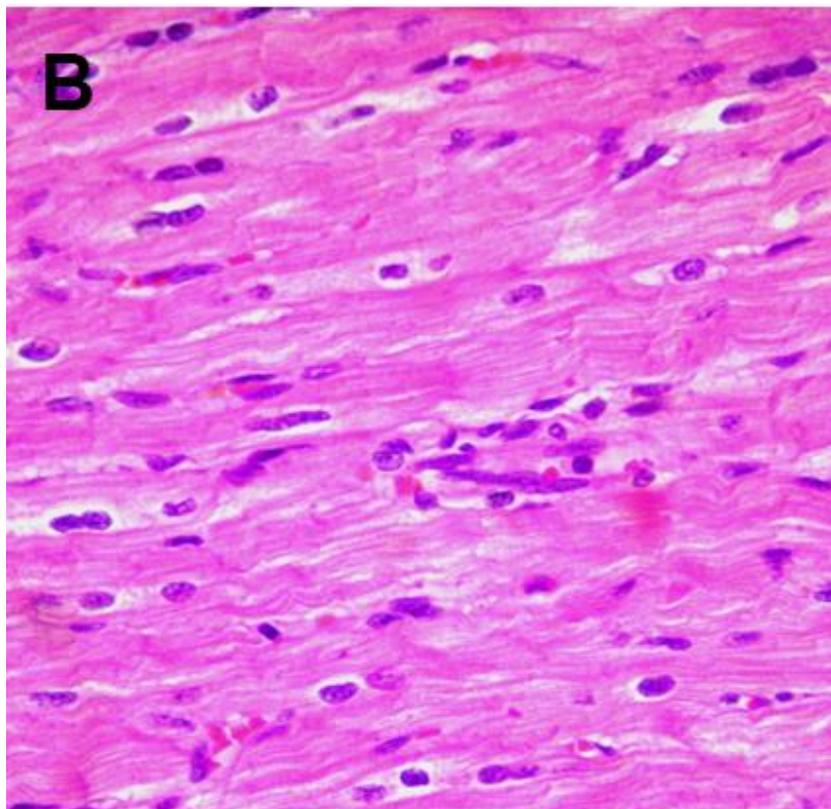
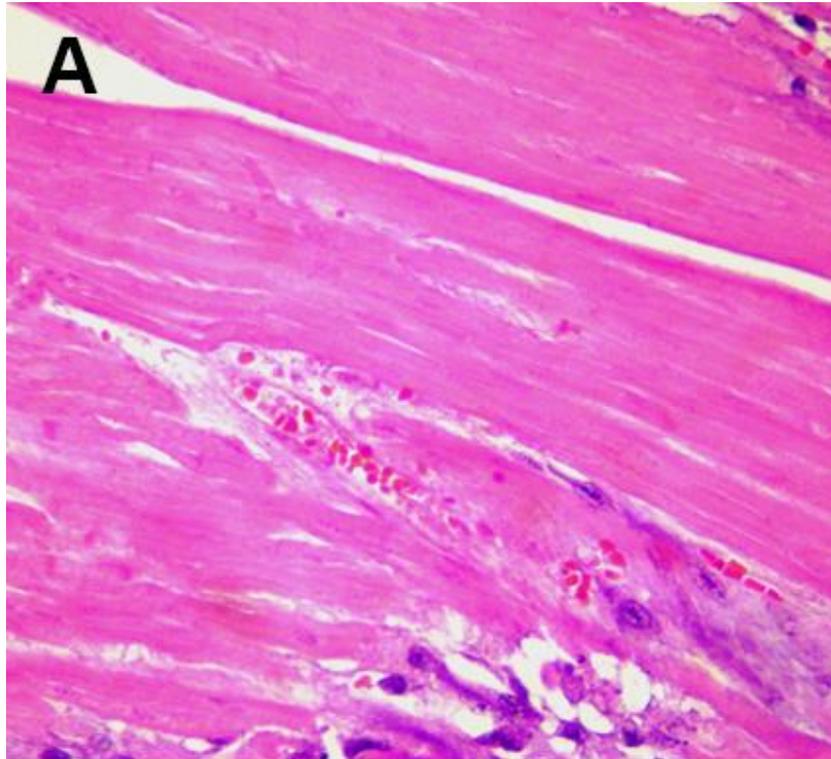


Fonte: Resultados do Experimento.

ACHADOS MICROSCÓPICOS

O estudo anatomopatológico microscópico descritivo mostrou a presença de áreas de necrose coagulativa dos cardiomiócitos (Figura 7-A) associada a extensa área de fibrose no grupo controle (Figura 7-B). Já no grupo dos suínos infartados submetidos a cardio-omentopexia, foi observado atenuação da quantidade de necrose coagulativa e de fibrose miocárdica na região infartada. Foi possível observar o desenvolvimento de neovascularização e repopulação de cardiomiócitos nos animais submetidos a cardio-omentopexia (Figura 8-A e 8-B).

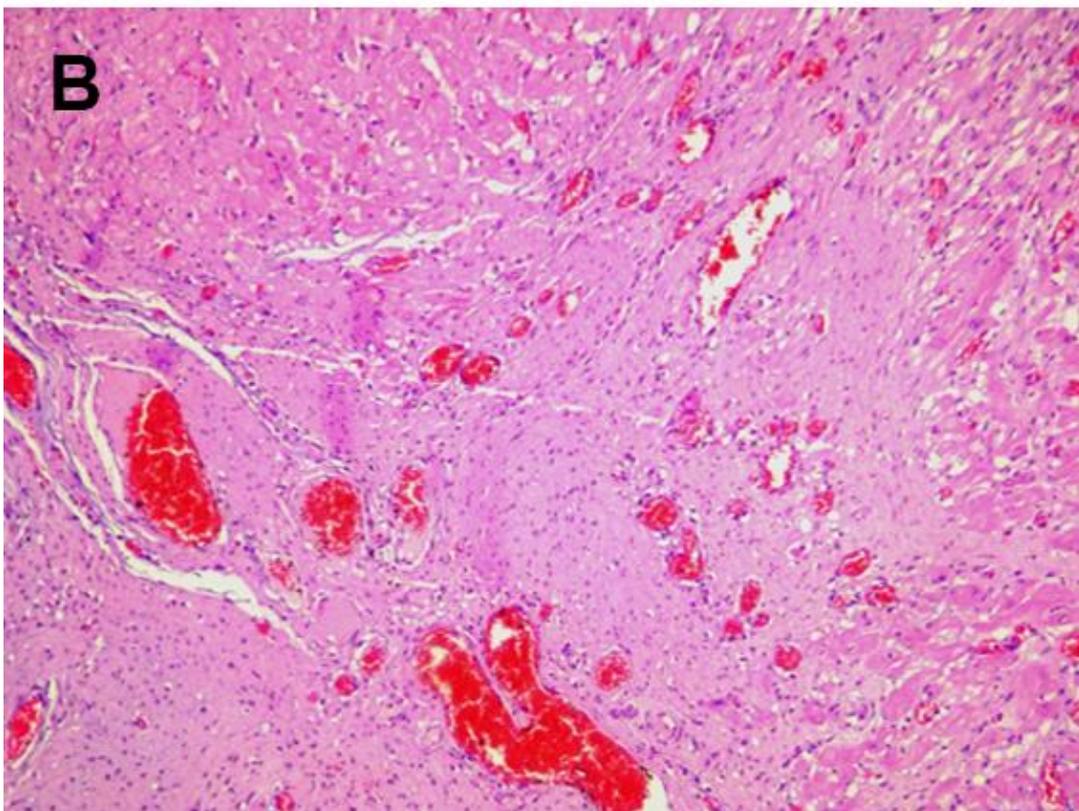
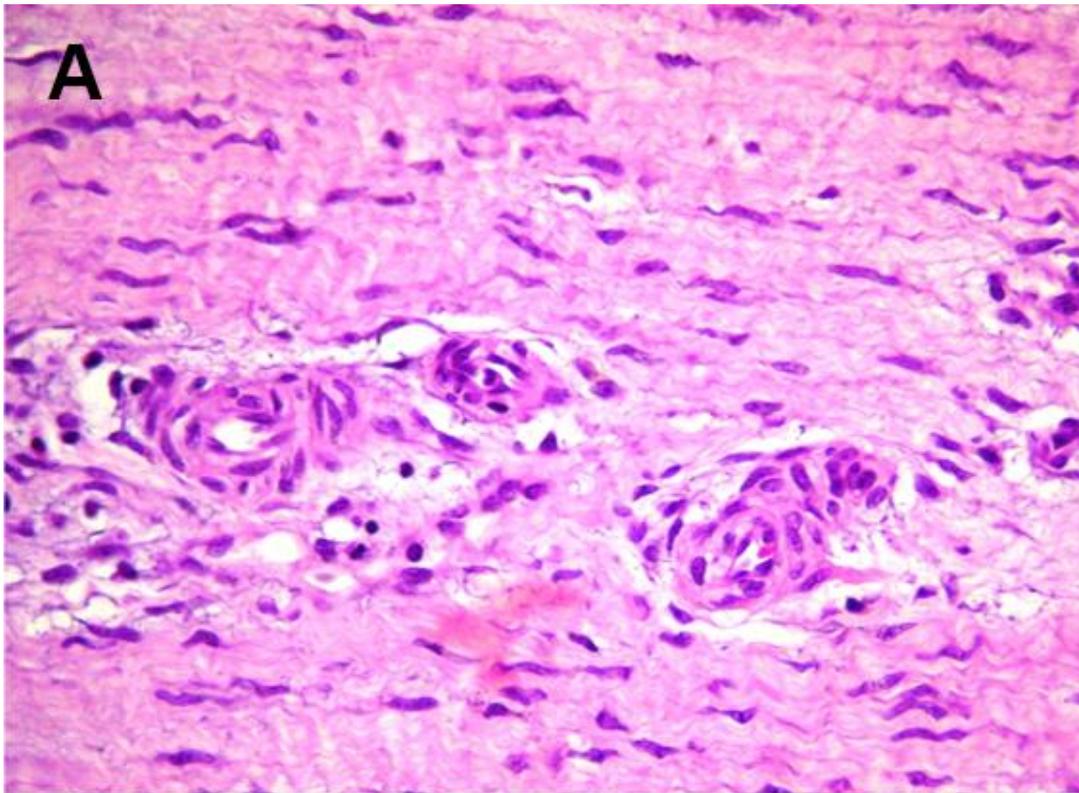
Figura 7 – Necrose Coagulativa dos Cardiomiócitos



Fonte: o autor (2020).

Legenda: Fotomicrografias representativas de tecido miocárdico infartado corado com hematoxilina-eosina. A. Grupo controle, mostrando necrose coagulativa extensa. B. Grupo cardio-omentopexia, demonstrando mínimo dano miocárdico, com miócitos dispostos longitudinalmente, núcleo ovalado e centralizado.

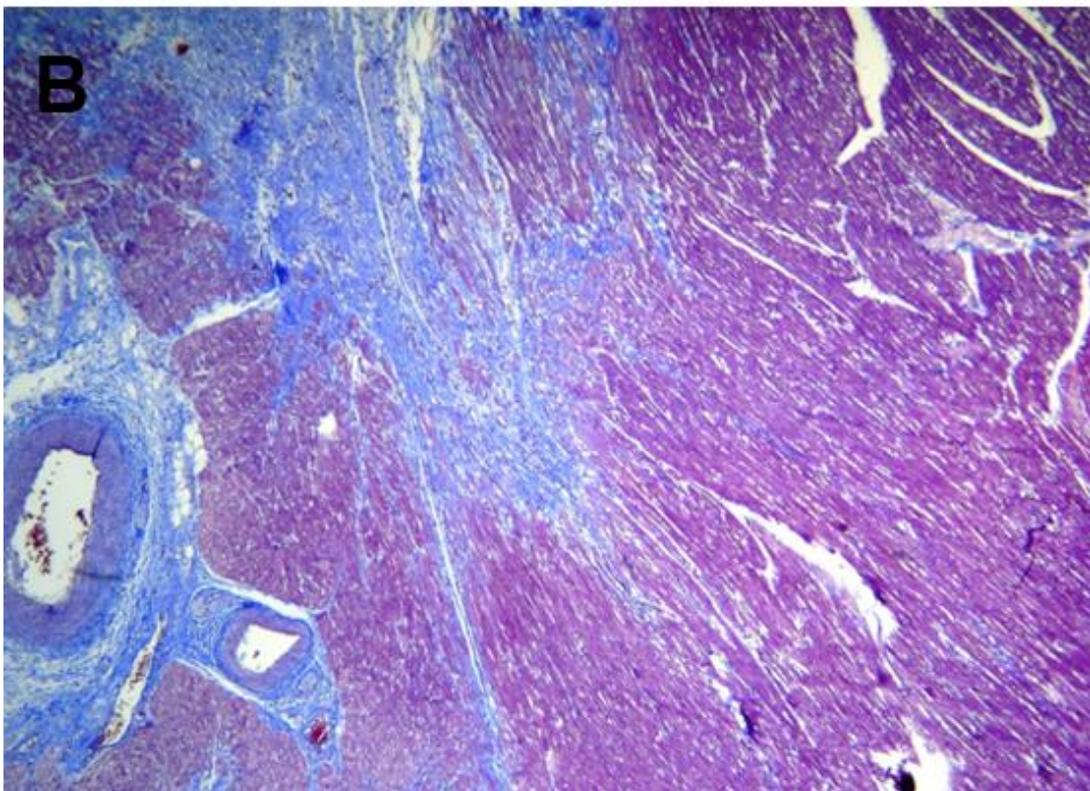
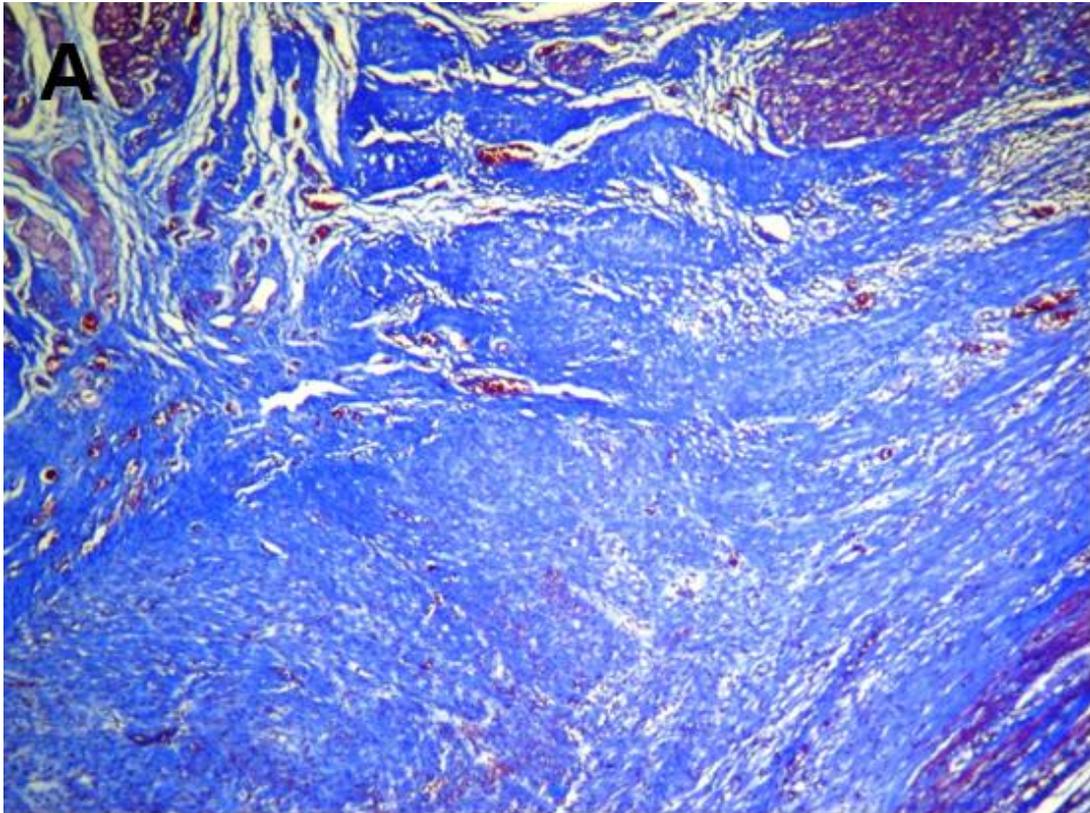
Figura 8 – Desenvolvimento de Neovascularização na Área Infartada



Fonte: o autor (2020).

Legenda: Fotomicrografias representativas de tecido miocárdico infartado corado com hematoxilina-eosina. A. Grupo controle, mostrando neovascularização ausente ou mínima. B. Grupo cardio-omentopexia, demonstrando neovascularização exuberante.

Figura 9 – Redução da Fibrose Miocárdica na Área Infarta



Fonte: o autor (2020).

Legenda: Fotomicrografias representativas de tecido miocárdico infartado corado com tricrômico de Masson. A. Grupo controle, mostrando extensa fibrose miocárdica. B. Grupo cardio-omentopexia, demonstrando redução da deposição de colágeno na área infartada.

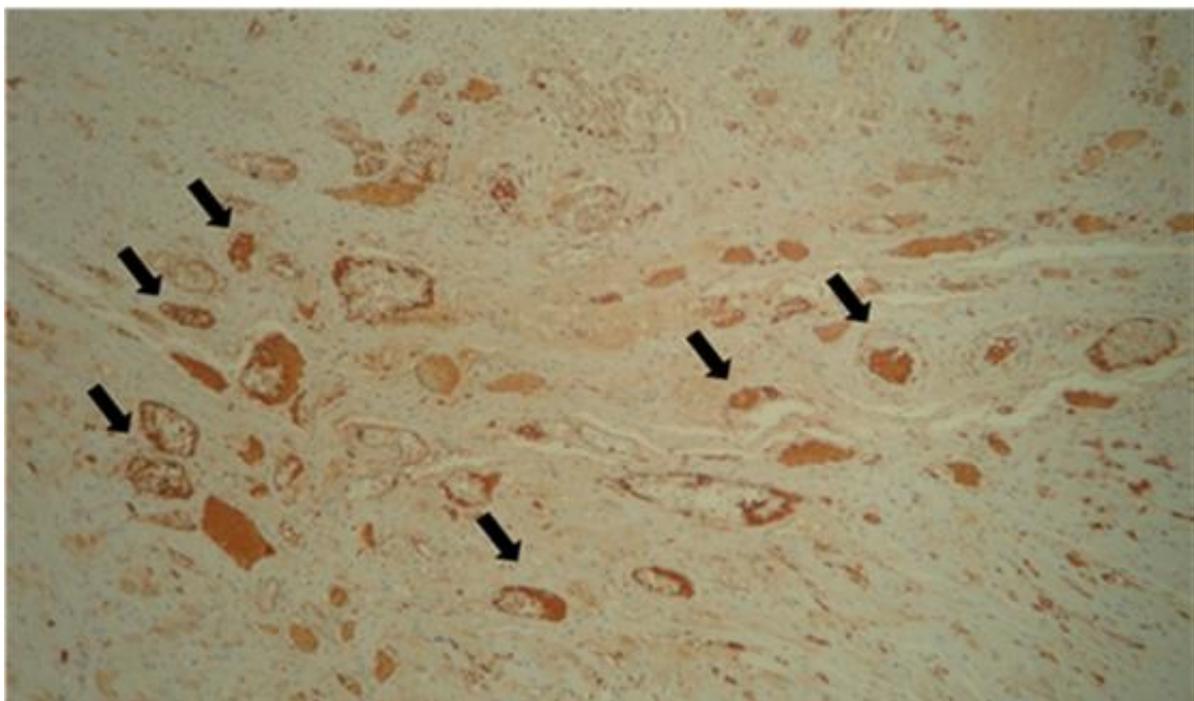
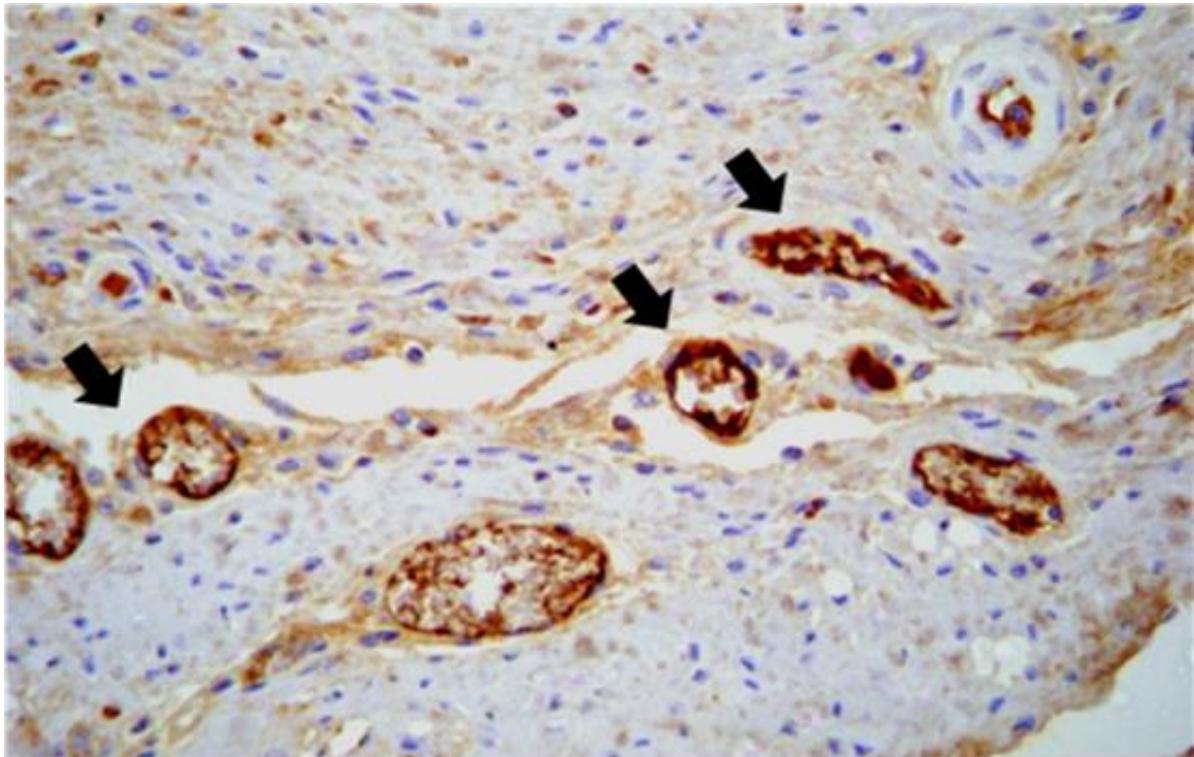
IMUNOHISTOQUÍMICA

Foram avaliadas 4 amostras de locais diferentes de cada animal, escolhidas de forma randomizada, totalizando 16 amostras histopatológicas. A marcação imunohistoquímica, de todas as amostras, com o anticorpo anti *mouse* CD34 IgG foi satisfatória. Foi observada no endotélio a mesma coloração acastanhada para as regiões coradas e a cor azulada para as não coradas (Figura 9).

Os 3 animais submetidos a omentopexia apresentaram na imunohistoquímica intensa neovasculogênese (Figura 9 e Figura 10). No animal sem omentopexia, não houve marcação imunohistoquímica pelo CD-34 demonstrando ausência de formação de novos vasos (Figura 9 e Figura 10).

A quantificação da imunomarcação a partir de sua intensidade (avaliação semiquantitativa) são detalhadas na Tabela 1. Em todas as amostras houve a marcação de pelo menos 1/4+, sendo que em 40% dessas amostras houve um aumento de 60% da angiogênese. Houve marcação mínima apenas no animal que não foi submetido a cardio-omentopexia (animal controle). A avaliação quantitativa da expressão de CD34 pelo tecido miocárdio está expressa na Tabela 2.

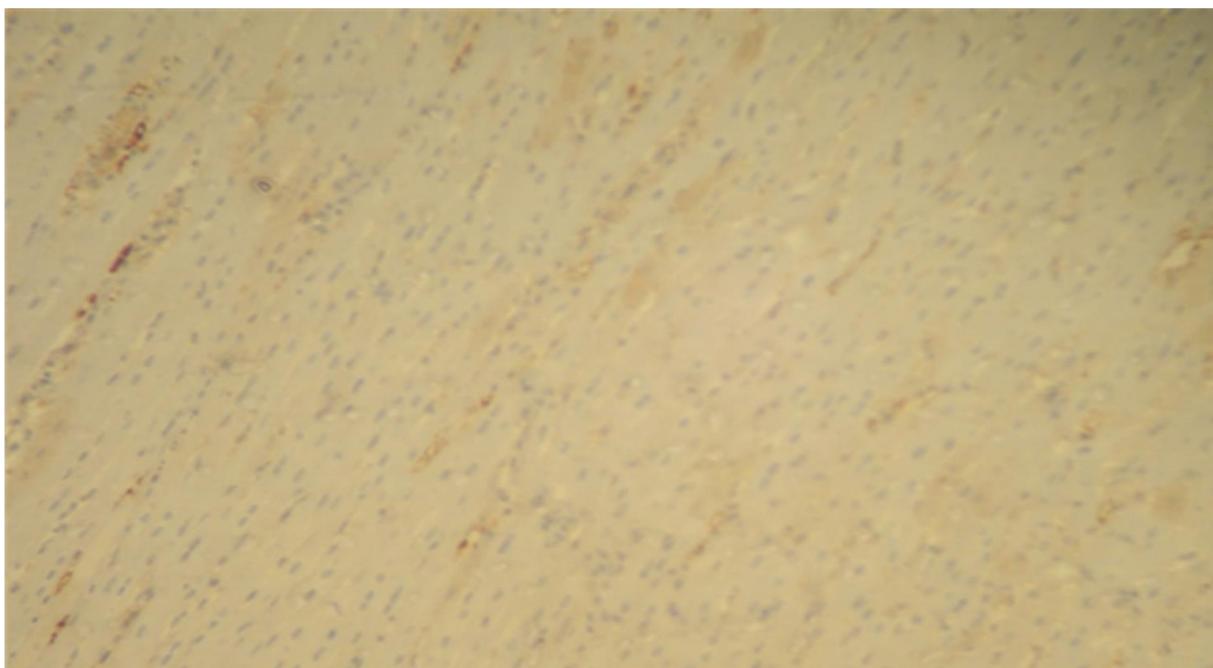
Figura 10 – Miocárdio infartado submetido a cardio-omentopexia mostrando vasos neoformados imunomarcados para CD34



Fonte: o autor (2020).

Legenda: Análise imunohistoquímica da expressão de CD 34 em tecido miocárdico infartado nos suínos submetidos à cardio-omentopexia. Setas demonstrando neoangiogênese pela marcação acastanhada do CD34. Regiões não marcadas em coloração azulada.

Figura 11 – Miocárdio infartado de animal controle mostrando a ausência/mínima expressão do imunomarcador CD34



Fonte: o autor (2020).

Legenda: Análise imunohistoquímica da expressão de CD 34 em tecido de tecido miocárdico infartado do suíno do grupo controle.

Tabela 1 – Escore em Cruzes Relativo à Análise da Intensidade/mm² do Imunomarcador CD-34

Suíno	Amostra	Resultado
1	4	1/3 +
1	6	2/3 +
1	7	2/3 +
1	8	2/3 +
2	1	1/3 +
2	6	1/3 +
2	7	2/3 +
2	8	1/3 +
3	3	2/3 +
3	4	2/3 +
3	5	2/3 +
3	9	1/3 +
4	4	2/3 +
4	6	1/3 +
4	7	1/3 +
4	8	Mínimo

Fonte: o autor (2020).

Legenda: 1/3+, reação fraca; 2/3+, reação moderada; 3/3 +, reação forte.

Tabela 2 – Avaliação Quantitativa da Área Marcada pelo CD34

Suíno	Área (%)
1	2,8
2	0,27
3	1,5
4	0,07

Fonte: o autor (2020).

DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que a população de células que sofreu diferenciação e se proliferou no miocárdio isquêmico é justamente aquela que traz benefício ao tecido. A utilização do omento no mesmo momento do procedimento de revascularização, sem necessidade de preparo ou procedimento prévio, se mostra como uma potencial grande vantagem, principalmente nos pacientes que se apresentam com doença coronariana grave e difusa e leitos distais de menor calibre. Esse é especificamente o padrão de doença observado nos pacientes com alto risco de desenvolvimento de insuficiência cardíaca isquêmica. O conceito de revascularização total do miocárdio é bem estabelecido na literatura como sendo o objetivo ideal (DIVAKA PERERA et al. 2022), porém sua execução nem sempre é possível com técnicas habituais de enxertias arteriais e venosas do tipo *bypass* a depender de calibre adequado de leitos coronarianos - justamente nesses pacientes a técnica da omentopexia pode ser um fator adjunto aditivo interessante. A técnica não substituiria a revascularização já idealizada ao paciente, potencialmente adicionaria benefício.

A quantificação da presença do CD34 nas lâminas nos leva a acreditar que as células que estão sendo doadas pelo omento são as células tronco de real interesse ao miocárdio isquêmico. O tempo de desenvolvimento da neovascularização, demonstrado pela eutanásia em trinta dias demonstra a rápida e difusa diferenciação que essas células são capazes de atingir.

A diferença observada entre as lâminas principalmente nas variáveis presença de fibrose e manutenção dos cardiomiócitos, demonstra que o omento é provavelmente capaz de suprir células tronco em quantidade elevada e contínua. Sendo recrutadas para regiões isquêmicas, conforme a concentração de fatores pro inflamatórios locais, decorrente da própria isquemia de forma quantitativa, o número de células doadas pelo omento foi suficiente, na nossa avaliação, para manutenção da arquitetura micro e macroscópica do tecido miocárdico. Isto pode ser facilmente observado comparando-se as figuras 5 e 6, que demonstram afilamento da parede ventricular exposta à isquemia. Adicionalmente, esse dado tem valor prognóstico bastante interessante, no que tange a manutenção da função ventricular e conseqüentemente a redução de risco de desenvolvimento da insuficiência cardíaca isquêmica a longo prazo, complicação bastante frequente e grave da doença coronariana.

A adição de técnicas com resultado positivos à cirurgia de revascularização do miocárdio no tratamento da doença coronariana é de grande interesse dada a gravidade e comorbidades presentes no curso da doença ao longo da vida. A utilização da omentopexia como terapia adjunta eficiente, de uso imediato ao ato cirúrgico de revascularização do miocárdio e sem a necessidade de preparo celular prévio, se mostra promissora para casos selecionados.

Existe a necessidade de dar continuidade à esta pesquisa com um número maior da amostra do grupo experimental e também aumento do intervalo entre o experimento e o sacrifício para melhor avaliação da neovascularização através do CD 34.

CONCLUSÃO

No presente estudo, a cardio-omentopexia associada à abração mecânica e perfurações miocárdicas, mostrou-se eficiente na indução de neovascularização, confirmada através da imunomarcção positiva para CD34.

REFERÊNCIAS

1. CHAPMAN, A. R.; ADAMSON, P. D.; MILLS, N. L. Assessment and classification of patients with myocardial injury and infarction in clinical practice. **Heart**, v. 103, n. 1, p. 10–18, 1 jan. 2017.
2. DI NICOLA, V. Omentum a powerful biological source in regenerative surgery Regenerative Therapy **Japanese Society of Regenerative Medicine**, v. 11, p 182-191, 1 dez. 2019.
3. Divaka Perera et al. Percutaneous Revascularization for Ischemic Left Ventricular Dysfunction **New England Journal of Medicine** August 27,2022
4. ESPE, E. K. S. et al. Regional dysfunction after myocardial infarction in rats. **Circulation: Cardiovascular Imaging**, v. 10, n. 9, 1 ago. 2017.
5. FRANGOIANNIS, N. G. Pathophysiology of myocardial infarction. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 4, p. 1841–1875, 1 out. 2015.
6. MILLNER, R. W. J. et al. Experimental model of left ventricular failure. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 52, n. 1, p. 78–83, 1991.
7. MOUTON, A. J.; RIVERA, O. J.; LINDSEY, M. L. **Myocardial infarction remodeling that progresses to heart failure: A signaling misunderstanding****American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**. American Physiological Society, , 1 jul. 2018.
8. NEUMANN, F. J. et al. **2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization****European Heart Journal**. Oxford University Press, , 7 jan. 2019.
9. OLIVEIRA, S. A. DE et al. Revascularização transmiocárdica com laser de CO2: experiência clínica inicial. **Arq. bras. cardiol**, v. 72, n. 4, p. 441–50, 1999.
10. PETRIZ, J. L. F. et al. Avaliação do infarto do miocárdio pela ressonância magnética cardíaca e mortalidade em longo prazo. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 104, n. 2, p. 159–168, 2014.
11. PUMA, F. et al. Laparoscopic omental flap for the treatment of major sternal wound infection after cardiac surgery. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 126, n. 6, p. 1998–2002, 2003.
12. RABBANI, S.; AHMADI, H.; FAYAZZADEH, E. Induced Myocardial Infarction Using Ligation of the Left Anterior Descending Coronary Artery Major Diagonal Branch: Development of an Ovine Model. **The Journal of Tehran University Heart Center**, v. 1, n. 2, p. 89–93, 2006.
13. ROTH, G. A. et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1736–1788, 10 nov. 2018.
14. RUEL, M. et al. Myocardial revascularization trials: Beyond the printed word. **Circulation**, v. 138, n. 25, p. 2943–2951, 18 dez. 2018.
15. SAÚDE, M. DA. **Banco de dados do Sistema Único de Saúde – DATASUS**. Disponível em: <<https://datasus.saude.gov.br/>>. Acesso em: 1 fev. 2022.
16. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **O Cardiômetro**. Disponível em: <<http://www.cardiometro.com.br>>. Acesso em: 1 fev. 2022.
17. TALMAN, V.; RUSKOAHO, H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration **Cell and Tissue Research**. v365, n3, p 563-581, 1 set. 2016.
18. THYGESEN, K. et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). **Journal of the American College of Cardiology**, v. 72, n. 18, p. 2231–2264, 30 out. 2018.
19. TSAI, S.-H. et al. Zoledronate Inhibits Ischemia-Induced Neovascularization by Impairing the Mobilization and Function of Endothelial Progenitor Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e41065, 25 jul. 2012.
20. VIRANI, S. S. et al. Heart disease and stroke statistics—2020 update: A report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 141, n. 9, p E139-E596, 29 jan 2020
21. WANG, H.; ROCHE, C. D.; GENTILE, C. Omentum support for cardiac regeneration in ischaemic cardiomyopathy models: a systematic scoping review. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 58, n. 6, p. 1118–1129, 1 dez. 2020.
22. WANG, J. et al. Cardio-omentopexy Reduces Cardiac Fibrosis and Heart Failure After Experimental Pressure Overload. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 107, n. 5, p. 1448–1455, 1 maio 2019.

Este preprint foi submetido sob as seguintes condições:

- Os autores declaram que estão cientes que são os únicos responsáveis pelo conteúdo do preprint e que o depósito no SciELO Preprints não significa nenhum compromisso de parte do SciELO, exceto sua preservação e disseminação.
- Os autores declaram que os necessários Termos de Consentimento Livre e Esclarecido de participantes ou pacientes na pesquisa foram obtidos e estão descritos no manuscrito, quando aplicável.
- Os autores declaram que a elaboração do manuscrito seguiu as normas éticas de comunicação científica.
- Os autores declaram que os dados, aplicativos e outros conteúdos subjacentes ao manuscrito estão referenciados.
- O manuscrito depositado está no formato PDF.
- Os autores declaram que a pesquisa que deu origem ao manuscrito seguiu as boas práticas éticas e que as necessárias aprovações de comitês de ética de pesquisa, quando aplicável, estão descritas no manuscrito.
- Os autores declaram que uma vez que um manuscrito é postado no servidor SciELO Preprints, o mesmo só poderá ser retirado mediante pedido à Secretaria Editorial do SciELO Preprints, que afixará um aviso de retratação no seu lugar.
- Os autores concordam que o manuscrito aprovado será disponibilizado sob licença [Creative Commons CC-BY](#).
- O autor submissor declara que as contribuições de todos os autores e declaração de conflito de interesses estão incluídas de maneira explícita e em seções específicas do manuscrito.
- Os autores declaram que o manuscrito não foi depositado e/ou disponibilizado previamente em outro servidor de preprints ou publicado em um periódico.
- Caso o manuscrito esteja em processo de avaliação ou sendo preparado para publicação mas ainda não publicado por um periódico, os autores declaram que receberam autorização do periódico para realizar este depósito.
- O autor submissor declara que todos os autores do manuscrito concordam com a submissão ao SciELO Preprints.