

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**  
**(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**TESE**

**ENXERTO OMENTAL LIVRE SEM ANASTOMOSE VASCULAR NA**  
**CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM RATOS**

**MARCELO DE OLIVEIRA HENRIQUES**

**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**  
**(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**ENXERTO OMENTAL LIVRE SEM ANASTOMOSE VASCULAR NA  
CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM RATOS**

**MARCELO DE OLIVEIRA HENRIQUES**

Sob a Orientação da Professora

**Marta Fernanda Albuquerque da Silva**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em  
Medicina Veterinária**, no Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária,  
Área de Concentração em Ciências  
Clínicas

Seropédica, RJ

Dezembro de 2018

H518e      Henriques, Marcelo de Oliveira, 1968-  
              Enxerto omental livre sem anastomose vascular na  
              cicatrização cutânea de ratos / Marcelo de Oliveira  
              Henriques. - Rio de Janeiro, 2018.  
              105 f.: il.

              Orientadora: Marta Fernanda Albuquerque da Silva.  
              Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
              Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Medicina  
              Veterinária, 2018.

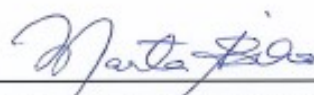
              1. Reparo tecidual. 2. Omento. 3. Fatores de  
              crescimento. 4. Expressão gênica. 5. Citocinas. I.  
              Silva, Marta Fernanda Albuquerque da, 1962-, orient.  
              II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
              Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária III.  
              Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

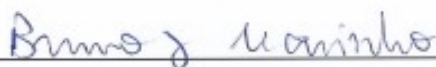
MARCELO DE OLIVEIRA HENRIQUES

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Medicina Veterinária, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

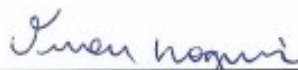
TESE APROVADA EM 14/12/2018



MARTA FERNANDA ALBUQUERQUE DA SILVA (Ph. D) UFRRJ -  
ORIENTADOR



BRUNO GUIMARÃES MARINHO ((Ph. D) UFRRJ



VIVIAN DE ASSUNÇÃO NOGUEIRA CARVALHO (Ph. D) UFRRJ



MARIA DE LOURDES GONÇALVES FERREIRA (Ph. D) UFF



VIVIANE ALEXANDRE NUNES DEGANI (Ph. D) UFF

## DEDICATÓRIA

Aos meus filhos Paula e Francisco, por servirem de motivação para que eu tente melhorar sempre, como pessoa e também profissionalmente. Pelo que representam para mim e para que entendam que com trabalho, esforço, dedicação e conhecimento vão conseguir atingir tudo que almejam. Obrigado por estarem sempre juntos, mesmo quando a distância nos separa. Vocês estão sempre nos meus pensamentos e no meu coração.

Aos meus pais, pela criação que me deram, por mostrarem o valor da educação e por me estimularem sempre. Todo o reconhecimento neste momento é pouco pelo que fizeram por mim.

À minha esposa, minha companheira de todas as horas, incluindo as de medicina veterinária e a quem devo muito na realização deste e de tantos projetos pessoais e de vida. Vou cuidar sempre de você.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à Professora Marta Fernanda Albuquerque da Silva, por ter me recebido na Pós-graduação e me orientado, por todo ensinamento e paciência ao longo destes anos de realização deste doutorado. Pelo exemplo profissional, pessoal e conhecimento inesgotável, por valorizar e incentivar seus orientados, além de otimismo, simpatia extrema e alegria no dia-a-dia, meu reconhecimento e respeito. Muito obrigado por tudo.

Aos amigos da Divisão Veterinária do Instituto de Biologia do Exército, pelo apoio na execução do experimento, pela amizade de sempre, companheirismo e ideias construtivas. Agradeço muito a todos, mas não poderia deixar de mencionar as Ten Janaína, Ten Catherine e Bruno Peralta pela imensa ajuda desde a confecção do projeto de pesquisa até a execução do experimento, com a anestesia dos animais e muitas horas de trabalho e bom humor, mesmo fora do expediente.

Aos amigos da Divisão de Ensino e Pesquisa (DEP) do Instituto de Biologia do Exército, Maj Marcos Dornelas, Maj Tatiana, Cap Caleb Guedes, farmacêuticos que ajudaram com ideias, com apoio em material, pela ajuda com a cessão dos laboratórios e equipamentos, mesmo nos horários mais inoportunos. Não seria possível a execução deste experimento sem a ajuda da DEP.

À Professora Gabriela De Bonis, pela execução das análises de Reação em Cadeia de Polimerase. Não tenho palavras para expressar meu agradecimento por todas as horas dispendidas no laboratório. Muito obrigado, agradeço por tudo, pelo bom humor de sempre e pelas excelentes discussões políticas e científicas.

À pesquisadora Fernanda Morgado, da Fundação Oswaldo Cruz, pela realização das análises imunohistoquímica. Agradeço imensamente por todo o apoio e tenho certeza que este projeto não seria concluído se não fosse a sua ajuda. Muito obrigado e estarei sempre em condições de ajudar no que for necessário.

A todos os professores e integrantes do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ, por terem participado desta etapa importante da minha vida, auxiliado e colaborado em muitas etapas.

Aos amigos pós-graduandos em Medicina Veterinária, pela amizade, apoio e estímulo. Foi um grande prazer participar da família do Instituto de Veterinária novamente, depois de tantos anos.

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

## **BIOGRAFIA**

MARCELO DE OLIVEIRA HENRIQUES, filho de Eugênio Henriques e Wilma de Oliveira Henriques, nascido em 10 de julho de 1968, na cidade do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro, cursou o primeiro grau na Escola Pio X, no período de 1974 a 1978 e no Colégio Pentágono, no período de 1979 a 1982. No Colégio Bahiense, ingressou em 1983, onde cursou o segundo grau, concluído em 1985.

Em 1986, ingressou na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em Seropédica-Rio de Janeiro, concluindo-o em 1990. Em 1991, ingressou no Exército Brasileiro, como Médico Veterinário, tendo servido no Rio de Janeiro-RJ (1991), Porto Alegre-RS (1992 a 1999), Resende-RJ (1999 a 2011), Rio de Janeiro-RJ (2011 a 2018), sempre em clínica e cirurgia de equinos.

Possui mestrado em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (2006) e especialização na Escola de Administração do Exército (1992), na Escola de Saúde do Exército, em inspeção de alimentos e bromatologia (1995), em ciências militares na Escola de Aperfeiçoamento do Exército (1998) e em Clínica e Cirurgia de Equinos, pela Faculdade de Jaguariúna, (2009). Ingressou no Doutorado em 2014, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Atualmente é Médico Veterinário do Hospital das Forças Armadas, em Brasília-DF.

## RESUMO

HENRIQUES, Marcelo de Oliveira. **Enxerto omental livre sem anastomose vascular na cicatrização cutânea de ratos**. 2018. 76 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Seropédica, RJ, 2018.

O processo de cicatrização em mamíferos está intimamente ligado à manutenção do meio interno e à sobrevivência do animal, sendo influenciado por fatores como vascularização local, estado nutricional, higidez, presença de infecção e doenças concomitantes, entre outros. Materiais biológicos têm sido recomendados no processo cicatricial por possuírem propriedades antibacterianas e analgésicas, acelerarem a formação de tecido de granulação, de epitelização e propiciarem barreira à invasão bacteriana. O omento tem sido usado na medicina humana e veterinária na cicatrização de feridas, por meio de enxertos pediculados ou livres, desde antes de 1900, entretanto o mecanismo pelo qual há auxílio na resolução de lesões não é completamente compreendido. A presença de ampla vascularização, de células de defesa inata e específica, denominados “*milky spots*” e células pluripotenciais mesenquimais tem sido determinada como preponderante para promover cicatrização e regeneração em tecidos injuriados. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a viabilidade e influência do enxerto de omento livre, sem anastomose vascular, na cicatrização de feridas cutâneas em ratos *Wistar* machos, que foram divididos em quatro grupos de sete animais, sendo dois grupos controle (CT7 e CT14) e dois tratados (OM7 e OM14), tendo sido realizadas as seguintes avaliações: macroscopia e morfometria das feridas, análises histopatológicas, quantificação de fibras de colágeno tipos I e III e pesquisa de citocinas e fatores de crescimento, como Fator de Crescimento de Endotélio Vascular (VEGF), Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF) e Fator de Crescimento Transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), por imunohistoquímica e por expressão gênica feita pela técnica de reação em cadeia de polimerase. Nos resultados macroscópicos, o enxerto permaneceu viável na ferida em todos os animais tratados, sem maiores complicações. Comparado ao grupo CT14, no grupo OM14 houve significativo aumento do infiltrado mononuclear e diminuição do TGF- $\beta$  aos 14 dias, sem diferença estatística nos demais parâmetros e momentos de avaliação. Estes achados no infiltrado mononuclear e na quantificação de TGF- $\beta$ , aos 14 dias de pós-cirúrgico, deve-se possivelmente às capacidades imunomoduladoras do omento. Pode-se concluir que a utilização do omento livre autólogo sem anastomose vascular na cicatrização cutânea é eficaz e viável, não tendo ocorrido rejeição, perda do enxerto ou ausência de cicatrização nas lesões agudas em ratos saudáveis.

**Palavras-chave:** Citocinas, Expressão gênica, Fatores de crescimento, Omento, Reparo tecidual.



## ABSTRACT

HENRIQUES, Marcelo de Oliveira. Free omental graft without vascular anastomosis in the cutaneous healing of rats. 2018. 76 p. Thesis (Doctorate in Veterinary Medicine). Institute of Veterinary Medicine, Seropédica, RJ,

The healing process in mammals is intimately connected to the maintenance of the internal environment and to the survival of the animal, being influenced by several factors, such as local vascularization, nutritional status, healthiness, presence of infection and concomitant diseases, among others. Biological materials have been recommended in the cicatricial process due to its analgesic and antibacterial attributes, accelerate the formation of granulation tissue and epithelization, provide a barrier to bacterial invasion. The omentum has been used in human and veterinary medicine related to the healing of wounds, through pedicled or free grafts, since before 1900, however, the mechanism by which there is assistance in the resolution of injuries is not fully comprehended. The presence of wide vascularization and innate and specific defense cells, called “milky spots” and mesenchymal pluripotential cells has been determined as preponderant to promote healing and regeneration in injured tissues. The objective of this study was to evaluate the viability and influence of the free omentum graft without vascular anastomosis on the healing process of cutaneous wounds in male Wistar rats, which were divided into four groups of seven animals, two control groups (CT7 and CT14) and two treated (OM7 and OM14), and the following evaluations were performed: macroscopy and morphometry of the wounds, histopathological analysis, quantification of type I and III collagen fibers, and research of cytokines and growth factors, such as Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Fibroblast Growth Factor (FGF) and Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), through immunohistochemistry and gene expression made by polymerase chain reaction technique. In the macroscopic results, the graft remained viable in the wound in in all treated animals, without major complications. Compared to the CT14 group, in the OM14 group there was a significant increase in mononuclear infiltrate and a decrease in TGF  $\beta$  at 14 days, with no statistical difference in the other parameters and moments of evaluation. These findings in the mononuclear infiltrate and the quantification of TGF- $\beta$  at 14 days postoperative, are possibly due to the immunomodulatory capacities of the omentum. It can be concluded that the use of autologous free omentum without vascular anastomosis in cutaneous healing is effective and viable, with no rejection, loss of graft or absence of healing in acute wounds in healthy rats

**Key words:** Cytokines, Gene expression, Growth factors, Omentum, Tissue repair.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ferida cutânea três dias após a lesão. Os fatores de crescimento considerados necessários para o movimento celular na ferida são mostrados: TGF - fator de crescimento transformador; FGF - Fator de crescimento de fibroblastos; VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular; PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas; IGF - fator de crescimento semelhante à insulina e KGF - fator de crescimento de queratinócitos (adaptado de SINGER; CLARK, 1999) ..... 9
- Figura 2.** Ferida cutânea cinco dias após a lesão. Vasos sanguíneos são vistos brotando no coágulo de fibrina, assim como células epidérmicas ressurgem na ferida. Proteinases consideradas necessárias para o movimento celular são mostradas: u-PA - ativador do plasminogênio do tipo uroquinase; MMP- metaloproteinases de matriz (colagenase 1, gelatinase A, estromelina 1 e colagenase 3, respectivamente) e t-PA - ativador do plasminogênio tecidual (adaptado de SINGER; CLARK, 1999) ..... 11
- Figura 3.** Perfil temporal das fases sincronizadas e ganho de força tênsil na cicatrização de feridas cutâneas. Deve-se notar que a escala de tempo é sugestiva e depende do tamanho e extensão da ferida (adaptado de STASHAK; THEORET, 2014) ..... 14
- Figura 4.** Omento de cão adulto, constituído de rede de trabéculas teciduais contendo um grande número de vasos que formam arcos comunicantes, com quantidade variável de tecido adiposo infiltrado (adaptado de LIEBERMANN-MEFFERT; WHITE, 2012) .. 17
- Figura 5.** Vistas ventro-laterais e cortes transversais através da região abdominal cranial de um embrião canino. A. Estômago em desenvolvimento mostrando a posição do mesogástrio dorsal e do mesogástrio ventral. B. Início da rotação gástrica para a esquerda e posição do baço no mesogástrio dorsal e fígado no mesogástrio ventral. C. Alongamento do mesogástrio dorsal e formação da bursa omental. O crescimento do fígado no mesogástrio ventral resulta na formação do omento menor dorsal ao fígado e do ligamento falciforme ventralmente (Adaptado de McGEADY et al., 2017) ..... 18
- Figura 6.** Nomenclatura, origem e distribuição individual das artérias (A) e veias (B) omentais no homem. O arco arterial gastroepiplóico muitas vezes não é completo (adaptado de LIEBERMANN-MEFFERT; WHITE, 2012) ..... 20
- Figura 7.** Estrutura dos “*Milky Spots*” (MS) no omento. (A) Esquema do omento inteiro em camundongos. (B) Estrutura do MS que são coleções soltas de leucócitos embutidos entre adipócitos logo abaixo da camada mesotelial. As linfócitos B formam um cluster central, enquanto os macrófagos e as células dendríticas tendem a acumular-se em torno do MS e também são encontradas individualmente em todo o omento. Linfócitos T e células linfóides inatas (ILC) podem ser misturados com as células B ou podem

agrupar-se em torno dos vasos sanguíneos. Células e antígenos são passivamente coletados da cavidade peritoneal através de fenestrações no mesotélio ou pode ser ativamente transportada por células fagocíticas como macrófagos (adaptado de MEZAPEREZ; RANDALL, 2017) .....	21
<b>Figura 8.</b> Diagramas ilustram as estruturas e a composição celular de um “milky spot” ativado. Dentro do “milky spot” e em seus arredores, as células linforreticulares estão aglomeradas, estando em contato próximo com os vasos sanguíneos e linfáticos. Aas lacunas no mesotélio permitem comunicação entre “milky spot” e a cavidade peritoneal. Mv - macrófagos ativados migratórios. Estruturas e células estão fora de escala (adaptado de LIEBERMANN-MEFFERT; WHITE, 2012) .....	22
<b>Figura 9.</b> Extensão omental. A, Omento maior exteriorizado, retraído cranialmente para liberá-lo de seus anexos pancreáticos. B, Folha dorsal do omento estendida caudalmente. C, Incisão em forma de L invertido apenas caudal ao ligamento gastroesplênico. D, Lado esquerdo girado caudalmente para alcançar a extensão total (adaptado de FOSSUM, 2007) .....	28
<b>Figura 10.</b> Utilização de retalho omental pediculado em revascularização do cérebro. a. Colocação do omento em um túnel subcutâneo ao longo do tórax. O omento será estendido ao longo do pescoço até o crânio. b. Craniotomia. c. Omento sendo mobilizado para recobrir defeito no crânio (adaptado de GOLDSMITH; CHEN; DUCKETT, 1973) .....	29
<b>Figura 11.</b> Uso de enxerto omental livre sem anastomose vascular na cicatrização cutânea de ratos. A - Punch metálico de biópsia. B – Imagem de rato em decúbito ventral com lesão cutânea recém-produzida por “punch” (dia 0) .....	38
<b>Figura 12.</b> Esquema ilustrativo do protocolo de análise de feridas em ratos com uso de enxerto omental livre e controles. As avaliações morfométricas e macroscópicas foram realizadas nos dias 0, 3, 7, 10 e 14 do experimento .....	39
<b>Figura 13.</b> Demarcação da área de feridas (linha branca pontilhada) em dorso de rato a partir de imagem digitalizada para mensuração pelo programa Image J .....	40
<b>Figura 14.</b> Esquema ilustrativo do protocolo de Análises “post-mortem” de fragmento de pele contendo a lesão em ratos com uso de enxerto omental livre e controles. As avaliações laboratoriais foram realizadas nos dias 7 e 14 do experimento (Adaptado de GEORGII, 2011) .....	41
<b>Figura 15.</b> Fluxograma ilustrativo do protocolo de avaliações de lesões cutâneas agudas em ratos com e sem o uso de enxerto omental livre sem anastomose .....	44
<b>Figura 16.</b> Evolução das lesões cutâneas de ratos avaliadas nos dias 0, 3, 7, 10 e 14 para	

posterior análise morfométrica com o software Image J. Grupos: CT7 - Controle 07 dias, OM7 – Omento 07 dias, CT14 - Controle 14 dias, OM14 - Omento 14 dias .....	49
<b>Figura 17.</b> Análise morfométrica das lesões cutâneas de ratos com ou sem o uso de enxerto omental livre sem anastomose vascular, aos sete dias pós-cirurgia. As áreas foram calculadas a partir das imagens obtidas nos dias 0, 3, 7 e analisadas com o software Image J. Os dados são expressos como média ± DP. * diferença significativa em relação ao momento d0 (*p < 0,05; **p <0,01); # diferença significativa entre os momentos d3 e d7 (#p<0,05; ##p < 0,01); não houve diferenças significativas entre os grupos Controle e Omento em nenhum dos momentos (p>0,05) .....	49
<b>Figura 18.</b> Análise morfométrica das lesões cutâneas de ratos com ou sem o uso de enxerto omental livre sem anastomose vascular, aos quatorze dias pós-cirurgia. As áreas foram calculadas a partir das imagens obtidas nos dias 0, 3, 7, 10 e 14 e analisadas com o software Image J. Os dados são expressos como média ± DP * diferença significativa em relação ao momento d0 (*p<0,05; **p<0,01); # diferença significativa em relação ao momento d3 (#p<0,05; ##p<0,01); não houve diferenças significativas entre os grupos Controle e Omento em nenhum dos momentos (p>0,05) .....	50
<b>Figura 19.</b> Avaliação histopatológica de lesão cutânea tratada com enxerto omental livre sem anastomose vascular aos sete dias de evolução da ferida (OM7) em rato, destacando-se o infiltrado inflamatório. (A) infiltrado neutrofilico moderado, coloração HE, objetiva 10x. (B) infiltrado mononuclear intenso, coloração HE, objetiva 20x .....	52
<b>Figura 20.</b> Avaliação histopatológica de lesão cutânea em rato tratado com enxerto omental livre, sem anastomose vascular, quanto a neovascularização (OM14) e edema (OM7). (A) formação difusa de vasos com presença de hemácias em seu interior, característico de neovascularização em omento, coloração HE, objetiva 20x. (B) fibras de colágeno levemente espaçadas em derme profunda, característico de edema, coloração HE, objetiva 20x .....	53
<b>Figura 21.</b> Avaliação histopatológica de lesão cutânea em rato tratado com enxerto omental livre, sem anastomose vascular, demonstrando a necrose (OM14) e fibrose (OM7). (A) extensa área de necrose em omento, coloração HE, objetiva 20x. (B) tecido cicatricial extenso caracterizando fibrose, coloração HE, objetiva 10x .....	55
<b>Figura 22.</b> Avaliação histopatológica de lesão cutânea em rato tratado com enxerto omental livre, sem anastomose vascular (OM7), evidenciando-se presença de bactérias e hemorragia. (A) focos discretos de substância amorfa fortemente basofílica sugestivo de colônia bacteriana (seta) em meio a extensa área de necrose e moderada presença de infiltrado inflamatório misto, coloração HE, objetiva 20x. (B) extensa área de	

hemorragia em meio a moderado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário em tecido omental na ferida, coloração HE, objetiva 20x .....	57
<b>Figura 23.</b> Expressão gênica do colágeno tipo III em lesões cutâneas agudas em ratos tratados com enxerto omental livre, sem anastomose vascular e controles. (A) Comparação entre grupos CT7 e OM7 (Controle $1,545 \pm 1,472$ vs Omento $0,684 \pm 0,183$ , $p = 0,6154$ ). (B) Comparação entre grupos CT14 e OM14 (Controle $1,192 \pm 0,839$ vs Omento $1,124 \pm 0,943$ , $p = 0,4156$ ) .....	59
<b>Figura 24.</b> Mensuração do Colágeno tipo I e tipo III, por imunohistoquímica, em lesões cutâneas agudas em ratos tratados com enxerto omental livre, sem anastomose vascular e controles. (A) Comparação entre grupos OM14 e CT14, quanto a colágeno tipo I (Controle $53,33 \pm 7,76$ vs Omento $53,04 \pm 11,20$ , $p = 0,1834$ ). (B) Comparação entre grupos OM14 e CT14, quanto a colágeno tipo III (Controle $55,10 \pm 11,82$ vs Omento $57,14 \pm 12,27$ , $p = 0,8919$ ) .....	59
<b>Figura 25.</b> Imunohistoquímica de tecido de granulação de lesões cutâneas de ratos, nos grupos controles e tratados com enxerto omental livre, aos 14 dias após a lesão. A. Omento – colágeno tipo I; B. Controle – colágeno tipo I; C. Omento – colágeno tipo III e D. Controle – colágeno tipo III, objetiva 20x .....	60
<b>Figura 26.</b> Expressão gênica do Fator de Crescimento de Endotélio Vascular (VEGF) em lesões cutâneas agudas em ratos tratados com enxerto omental livre, sem anastomose vascular e controles. (A) Comparação entre grupos OM7 e CT7 - Controle $0,829 \pm 0,419$ vs Omento $0,606 \pm 0,378$ , $p = 0,0898$ . (B) Comparação entre grupos OM14 e CT14 - Controle $0,854 \pm 0,502$ vs Omento $1,404 \pm 0,668$ , $p = 0,1508$ .....	61
<b>Figura 27.</b> Imunohistoquímica de tecido de granulação de lesões cutâneas de ratos, nos grupos controles e tratados com enxerto omental livre, aos 14 dias após a lesão, para fator de crescimento de endotélio vascular. A. Omento; B. Controle, objetiva 20x .....	62
<b>Figura 28.</b> Mensuração do Fator de Crescimento de Endotélio Vascular (VEGF), por imunohistoquímica, em lesões cutâneas agudas em ratos tratados com enxerto omental livre, sem anastomose vascular e controles. Comparação entre grupos OM14 e CT14 - CT $49,58 \pm 8,19$ vs OM $52,30 \pm 9,11$ , $p = 0,6975$ .....	62
<b>Figura 29.</b> Expressão gênica do Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF2) em lesões cutâneas agudas em ratos tratados com enxerto omental livre, sem anastomose vascular e controles. (A) Comparação entre grupos OM7 e CT7 – CT $1,385 \pm 1,234$ vs OM $0,721 \pm 0,318$ $p = 0,6154$ . (B) Comparação entre grupos OM14 e CT14 (CT $0,806 \pm 0,266$ vs OM $0,652 \pm 0,293$ , $p = 0,8527$ ) .....	63
<b>Figura 30.</b> Mensurações por meio de Imunohistoquímica de Fator de Crescimento	

Transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) em lesões cutâneas agudas em ratos tratados com enxerto omental livre, sem anastomose vascular e controles. Comparação entre grupos OM14 e CT14 (CT  $58,58 \pm 21,52$  vs OM  $51,36 \pm 8,12$ ,  $p = 0,0008$ ). \*\*\* diferença significativa entre os grupos ..... 64

**Figura 31.** Imunohistoquímica de tecido de granulação de lesões cutâneas de ratos, nos grupos controles e tratados com enxerto omental livre, aos 14 dias após a lesão, para fator de crescimento transformador  $\beta$ . A. Omento; B. Controle, objetiva 20x ..... 65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Tamanho do omento de diferentes espécies adultas em largura e comprimento (adaptado de LIEBERMANN-MEFFERT; WHITE, 2012) .....	19
<b>Tabela 2.</b> Relação de anticorpos utilizados em imunohistoquímica de lesões cutâneas em ratos com o uso de enxerto omental livre sem anastomose vascular .....	42
<b>Tabela 3.</b> Relação de primers utilizados em RT-PCR para avaliação da expressão gênica em lesões cutâneas em ratos com o uso de enxerto omental livre sem anastomose vascular .....	43
<b>Tabela 4.</b> Frequência de observações na avaliação microscópica de cicatrização cutânea em ratos tratados com enxerto omental livre, sem anastomose vascular, em comparação com grupos controle .....	51
<b>Tabela 5.</b> Resultados da avaliação estatística pelo Teste de Mann-Whitney de comparação entre características histopatológicas na cicatrização de feridas cutâneas de ratos saudáveis, com e sem o uso de enxerto omental sem anastomose vascular .....	57

## LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem  
 $\alpha$ -Sma -  $\alpha$ -Actina de músculo liso  
 $\mu\text{m}$  – micrômetro  
ADP - Adenosina difosfato  
AEC - 3-amino-9-etilcarbazol  
cDNA - DNA complementar  
cm – centímetro  
CTAP - Peptídeo ativador de tecido conjuntivo  
CTGF - Fator de crescimento de tecido conectivo  
DAB - 3,3 diaminobenzidina tetrahidrocloro  
DSVP - Plexo venular superficial profundo  
ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
EROS - Espécies reativas de oxigênio  
FALC - Fat-associated lymphoid cluster  
FGF - Fator de Crescimento de Fibroblastos  
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz  
GAG – Glicosaminoglicanos  
GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos  
HE - Hematoxilina-Eosina  
HKG – Gene housekeeping ou gene de referência ou de controle interno  
IBEx – Instituto de Biologia do Exército  
IFN – Interferon  
IGF – Fator de crescimento semelhante à insulina  
IH – imunohistoquímica  
IL – Interleucina  
ILC - células linfóides inatas  
iNOS - Óxido nítrico sintase induzida  
KGF - Fator de crescimento de queratinócitos  
L – litro  
LPS – Lipopolissacarídeos  
MEC - Matriz extracelular  
miRNA - Micro RNA  
mm – milímetro



MMP- Metaloproteinases de matriz  
mRNA - RNA mensageiro  
MS - milky spots  
nm – Nanômetro  
NO - Óxido nítrico  
NOS – Óxido Nítrico Sintase  
OC - Células omentais  
pb – Pares de bases  
PCR - Reação em Cadeia de Polimerase  
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas  
PRP - plasma rico em plaquetas  
SAP - Plexo arterial superficial  
SPARC - Proteína secretada ácida e rica em cisteína  
TBS – Tampão fosfato-salino  
TGF – Fator de crescimento transformador  
TIMP - Inibidor tecidual de metaloproteinases  
TNF - Fator de necrose tumoral  
t-PA - Ativador do plasminogênio tecidual  
u-PA - Ativador do plasminogênio do tipo uroquinase  
UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
VEGF - Fator de crescimento de endotélio vascular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>03</b>
<b>2.1 A Pele .....</b>	<b>03</b>
<b>2.2 Cicatrização e Regeneração Tecidual .....</b>	<b>05</b>
2.2.1 Fase inflamatória .....	06
2.2.2 Fase proliferativa ou fibroblástica .....	10
2.2.3 Fase de maturação ou de remodelamento .....	13
<b>2.3 Omento .....</b>	<b>15</b>
2.3.1 Anatomia, histologia e fisiologia .....	16
2.3.2 Uso em cirurgias .....	24
2.3.2.1 Retalhos omentais (pediculados) .....	26
2.3.2.2 Enxerto omentais (não pediculados) .....	30
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>34</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Apreciação Bioética .....</b>	<b>35</b>
<b>4.2 Animais e Local do Experimento .....</b>	<b>35</b>
<b>4.3 Grupos Experimentais .....</b>	<b>35</b>
<b>4.4. Produção da lesão cutânea, coleta e implantação do omento .....</b>	<b>36</b>
<b>4.5 Eutanásia .....</b>	<b>38</b>
<b>4.6 Avaliações .....</b>	<b>38</b>
4.6.1 Análises “ante-mortem” .....	39
4.6.1.1 Análise macroscópica .....	39
4.6.1.2 Análises morfométricas .....	39
4.6.2 Análises “post-mortem” .....	40
4.6.2.1 Avaliação histopatológica .....	41
4.6.2.2 Imunohistoquímica .....	41
4.6.2.3 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) .....	43
4.6.3 Análise estatística .....	45
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>5.1 Avaliações Macroscópicas e Morfométricas .....</b>	<b>46</b>
<b>5.2 Avaliações histopatológicas .....</b>	<b>50</b>

<b>5.3 PCR e Imunohistoquímica .....</b>	<b>58</b>
5.3.1 Colágeno .....	58
5.3.2 Fatores de crescimento .....	60
5.3.2.1 Fator de Crescimento de Endotélio Vascular (VEGF) .....	60
5.3.2.2 Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF) .....	62
5.3.2.3 Fator de Crescimento transformador $\beta$ (TGF- $\beta$ ) .....	63
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>68</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A pele exerce funções consideradas vitais para os animais, tais como proteção mecânica contra a entrada de microrganismos, a regulação térmica, proteção contra a perda corpórea de água, eletrólitos e macromoléculas, fornece ainda informações sensoriais, promove a síntese de vitamina D<sub>3</sub>, entre outras. As afecções cutâneas passíveis de intervenção cirúrgica são frequentes na rotina veterinária e constituem um desafio para o profissional, pela elevada ocorrência de complicações. Outro fator a ser considerado é que tratamentos cirúrgicos em outros sistemas acabam por promover lesões cutâneas para a realização do acesso cirúrgico.

O processo cicatricial envolve ampla gama de eventos celulares e moleculares, não ainda completamente elucidados, que ocorrem de forma simultânea e cooperativa, com a finalidade de promover a reconstrução tecidual e a preservação do meio interno. Este processo de cicatrização envolve eventos inflamatórios, de proliferação tecidual ou granulação, deposição de matriz extracelular, remodelamento e epitelização do local traumatizado.

Desde o século XIX, o omento maior vem sendo utilizado em diversos procedimentos cirúrgicos, na medicina e na medicina veterinária, na forma de enxertos pediculados ou livres, com ou sem anastomose vascular, em cirurgias variadas, como em enfermidades gastrointestinais, vasculares, ósseas e reconstrutivas. Atualmente, técnicas menos invasivas têm sido propostas para pacientes veterinários e a aplicação cirúrgica do omento tem se tornado uma opção terapêutica aos retalhos cutâneos e músculos-cutâneos, sendo cada vez mais importante pelos resultados obtidos.

As características do omento em uma ferida cirúrgica são conhecidas há muito tempo e incluem aumento na vascularização local, com conseqüente aumento na tensão de oxigênio e dos níveis de fatores humorais locais, além de aumento do número de células fagocíticas no foco da lesão. A presença de células omentais, com capacidades pluripotenciais, uma vez ativadas por estímulos inflamatórios ou por corpos estranhos, vem ganhando destaque nas pesquisas com o uso do omento em cicatrização em diversos tecidos, desde feridas cutâneas e até mesmo em sistema nervoso.

A técnica cirúrgica com omento pediculado, no qual é mantido o suprimento vascular, ou seja, com formação de pedículo, apresenta algumas limitações quanto à distância do local da ferida a ser manejada, assim como maior dano ao paciente, seja pela criação de túnel subcutâneo para a passagem do pedículo ou pela necessidade de abertura da cavidade abdominal, muitas vezes em mais de um local. A possibilidade de enxertos omentais livres, com resultados similares aos enxertos pediculados, abre possibilidades de uso mais extenso na rotina veterinária, com manejo de feridas de difícil cicatrização.

Os enxertos de pele em medicina veterinária apresentam dificuldades de incorporação com variações entre as espécies. O presente projeto se justifica pela investigação da eficácia do enxerto omental livre sem anastomose vascular na cicatrização e sua viabilidade, levando-se em conta seus efeitos benéficos relatados na literatura, como aumento da vascularização local, dos fagócitos e dos fatores de crescimento locais. A possibilidade real de utilização da técnica proposta em ferimentos de grande extensão ou de cicatrização complicada, seja pela presença de infecção, suprimento sanguíneo deficiente ou excesso de tensão na ferida, reforça a justificativa da realização do estudo.

A ciência evoluiu e novas técnicas diagnósticas se tornaram mais acessíveis, permitindo quantificar a presença de células e moléculas importantes na resolução de uma ferida. O trabalho teve por objetivo avaliar a influência do enxerto de omento livre sem anastomose vascular na cicatrização cutânea de ratos, por meio de suas características macroscópicas, morfométricas, celulares e moleculares nas áreas lesionadas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A sobrevivência requer a eliminação de agentes infecciosos e tecidos lesados, assim como corpos estranhos, através de mecanismos inflamatórios envolvendo vasos sanguíneos, mediadores inflamatórios e células do hospedeiro, com a finalidade de eliminar os agentes agressores e reparar o local.

O reparo de feridas é um dos processos biológicos mais complexos que ocorrem durante a vida dos organismos, mobilizando várias vias que devem ocorrer ao mesmo tempo para que haja sucesso na resposta. Em mamíferos adultos, a capacidade regenerativa é limitada, havendo a tendência a formação de cicatriz, tecido fibroso e não funcional, em substituição ao tecido original. Em contraste, tecidos fetais ou organismos menos complexos possuem capacidades regenerativas em que tecidos lesionados podem voltar a ser funcionais, sem formação de tecido fibrótico. O melhor conhecimento destes processos de reparo e regeneração podem viabilizar novos tratamentos e melhores resultados na prática da medicina veterinária.

Independente do agente agressor e do tecido injuriado, os mecanismos de cicatrização são os mesmos, com uma fase inicial que envolve a formação de coagulação sanguínea, seguida de inflamação e de proliferação tecidual, com uma fase final de remodelação, o que permite a extrapolação dos resultados obtidos em feridas cutâneas para os demais tecidos. O processo de reparo tecidual é bem descrito ao nível histológico, mas os genes que regulam o reparo estão sendo identificados, através das expressões de seus fatores de crescimento e citocinas.

### 2.1 A Pele

A pele recobre a superfície do corpo, sendo constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme, que se mantêm distintas por uma membrana basal. Abaixo e em continuidade com a derme, encontra-se a hipoderme ou tecido subcutâneo, que não faz parte da pele, apenas lhe serve de união com os órgãos subjacentes, sendo um tecido conjuntivo frouxo que pode conter muitas células adiposas, constituindo o panículo adiposo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A pele é um órgão protetor e fornece funções vitais como modulação de temperatura, regulação de umidade, bem como sensação, recepção e transmissão. A capacidade de reparar e regenerar é fundamental para essas funções. O reparo de feridas é uma série coordenada de fases que têm tipos de células previsíveis e preparações de microambiente (CHILDS; MURTHY, 2017).

A epiderme é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado no qual podem ser identificadas cinco camadas diferentes: camada ou estrato basal também designado como estrato germinativo, responsável pela manutenção da espessura constante da pele; camada ou estrato espinhoso composto por queratinócitos que apresentam prolongamentos citoplasmáticos de tonofibrilas de queratina; camada ou estrato granuloso responsável pela função de barreira hídrica da pele formada por queratinócitos contendo grânulos de queratoialina e corpos lamelares; camada ou estrato lúcido presente somente na pele espessa (palma das mãos e planta dos pés) e camada ou estrato córneo. Além dos queratinócitos, também são encontrados na epiderme outros tipos celulares como melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. Por sua vez, a derme pode ser dividida em duas camadas sem uma área de transição característica: a papilar que está logo abaixo da membrana basal da epiderme e a reticular localizada mais profundamente (GARTNER; HIATT, 2007).

A pele é um dos maiores órgãos, alcançando 16% do peso corporal, e desempenha múltiplas funções. Graças à camada queratinizada da epiderme, o organismo é protegido contra desidratação e atrito. Por meio de suas terminações nervosas sensoriais, recebe constantemente informações sobre o ambiente e as envia para o sistema nervoso central. Graças a seus vasos sanguíneos, glândulas e tecido adiposo, colabora com a termorregulação do corpo. Suas glândulas sudoríparas participam da termorregulação e da excreção de várias substâncias. A melanina produzida e acumulada na epiderme tem função protetora contra os raios ultravioleta. Na pele, se forma vitamina D<sub>3</sub> pela ação da radiação ultravioleta do sol sobre precursores sintetizados no organismo. Apresenta ainda células do sistema imune, que atuam contra a invasão de microrganismos. A junção entre a epiderme e a derme é irregular. A derme tem projeções, as papilas dérmicas, que se encaixam em reentrâncias da epiderme, as cristas epidérmicas, aumentando a coesão entre essas duas camadas. Pelos, unhas e glândulas sudoríparas, sebáceas e mamárias são estruturas anexas da pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A matriz extracelular (MEC) da derme contém dois principais constituintes, com o colágeno fibrilar sendo responsável pela força mecânica e os glicosaminoglicanos (GAG) que

contribuem para a hidratação, que por possuírem carga negativa, atraem cátions, principalmente o sódio, que acaba por carrear moléculas de água para a derme (SCOTT; GHAHARY; TREDGET, 2000).

## 2.2 Cicatrização e Regeneração Tecidual

A capacidade autorregenerativa é um fenômeno universal em organismos vivos e ocorre de duas formas, seja pela regeneração com a recomposição da atividade funcional do tecido ou pela cicatrização com restabelecimento da homeostase do tecido com perda da sua atividade funcional e formação de cicatriz fibrótica. Danos tissulares de qualquer natureza (física, química ou biológica) desencadeiam de imediato uma série de eventos que se manifestam pelos sinais flogísticos, como dor, calor, rubor e tumor. Estes sinais resultam da ativação de células nervosas, estromais, vasculares e circulatórias por estímulos físicos ou por sinalização química, feitos por estruturas celulares danificadas, fragmentos de colágeno, elastinas, fibronectina, por proteínas séricas extravasadas e ação de mediadores inflamatórios (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A pele é o órgão no qual a cicatrização é mais facilmente observada, tanto pela extensão quanto pela superficialidade, por isso vem servindo de ponto de partida para estudo dos fenômenos de reparação ao longo da pesquisa médica. A cicatrização de feridas é dividida em fases bem descritas com base em estudos microscópicos, que se sobrepõem e possuem características e duração variadas, de acordo com fatores relacionados com o agente traumático, a área atingida e a resposta orgânica (SILVA, 2012).

Os mamíferos mantiveram grande parte da maquinaria molecular utilizada por organismos como os anfíbios, mas seu potencial regenerativo é limitado. Em parte, isso parece resultar da rápida interposição do tecido fibrótico, o que dificulta a posterior regeneração tecidual. Por exemplo, quando a medula espinhal de ratos é lesionada, os neurônios começam a crescer, mas as células gliais no local da lesão estimulam a formação de cicatriz, evitando a recuperação. No entanto, se a medula espinhal de rato é seccionada e a formação de cicatrizes dificultada, os neurônios podem voltar a se reconectar. Esta rápida interposição de tecido cicatricial provavelmente confere uma vantagem de sobrevivência, impedindo que microrganismos invadam a ferida e inibe a deformação mecânica de tecidos, um processo que poderia agravar a injúria inicial (GURTNER et al, 2008).

A resolução de lesões pela fibrose, em vez da regeneração, coloca um enorme fardo na saúde pública em medicina humana. O custo econômico total das doenças resultantes da



fibrose é difícil de calcular com precisão, mas é da ordem de dezenas de bilhões de dólares. Importante ressaltar que a cicatrização disfuncional geralmente causa incapacidade ao longo da vida, o que tem um impacto econômico significativo. Assim, se os processos de resolução fibrótica puderem ser transformados em regenerativos, nos quais os tecidos originais sejam restaurados, isso melhoraria consideravelmente a saúde. Uma hipótese principal é que o sistema imunológico está envolvido na mudança entre regeneração e cicatrização fibrótica, porque os fetos humanos, que se curam sem cicatriz, possuem sistemas imunes imaturos (GURTNER et al, 2008).

Estudos aprofundados sobre os processos bioquímicos da reparação tecidual mostram que importantes grupos de substâncias (citocinas e fatores de crescimento), produzidas e liberadas após a instalação de uma lesão e durante as diferentes fases de sua reparação, estimulam ou inibem a atividade de vários tipos celulares, de forma complexa e orquestrada, quando o ambiente é favorável, como níveis adequados de oxigênio, nutrientes e pH (SILVA, 2012).

A sinalização e comunicação para haver a cicatrização são realizadas por muitos tipos de células interagindo entre si e o balanço de várias citocinas pró e anti fibróticas possui impacto significativo no resultado final. A complexa rede de sinalização atua em receptores de superfície e também intracelulares, influenciando a interação e o comportamento celular no foco da ferida (KWAN; TREDGET, 2017).

A melhor forma de cicatrização de uma ferida cutânea é por primeira intenção, que é definido como fechamento direto da ferida após a lavagem e debridamento, indicado e preferido para feridas limpas, incluindo feridas cirúrgicas e feridas contaminadas que foram debridadas e têm menos de 6 horas, mediante sutura cirúrgica, o que deve ser realizado o mais rapidamente possível após a lesão. As limitações deste procedimento incluem localização da ferida, em que seja possível a aproximação das margens, entretanto feridas amplas e profundas normalmente não possibilitam o fechamento primário, devendo ocorrer a cicatrização por segunda intenção, definida como fechamento após a formação de tecido de granulação e mais comumente usada para feridas contaminadas. Ocorre de forma lenta e mais susceptível a complicações, como infecção e formação de tecido de granulação exuberante (SOUZA et al, 2014; KIRPENSTEIJN; HAAR, 2013).

### 2.2.1 Fase Inflamatória

O evento inicial quando ocorre uma ferida é a formação de um tampão plaquetário que limita o sangramento e inicia a sinalização de citocinas. Imediatamente após a lesão inicia-se a primeira fase (inflamatória) do reparo tecidual com ativação da cascata de coagulação, atividade do sistema complemento, assim como, pela liberação de fatores de crescimento e citocinas, para promover a amplificação e recrutamento de células para o debridamento de tecido não viável (CHILDS; MURTHY, 2017).

A resposta inflamatória pode ser subdividida em resposta vascular e celular. Na resposta vascular, a hemostasia é o primeiro passo para a cicatrização e consiste no desenvolvimento de um coágulo de fibrina e no processo de coagulação (SCHÄFFER; WITTE; BECKER, 2002). Componentes da cascata de coagulação, vias inflamatórias e sistema imunológico são necessários para evitar perdas contínuas de sangue e fluidos, para remover os tecidos mortos e desvitalizados e para prevenir a infecção (GURTNER et al, 2008).

As plaquetas são as primeiras a chegarem ao local da lesão e uma vez expostas e ativadas pela matriz extracelular lesionada, liberam diversos mediadores como serotonina, adenosina difosfato (ADP) e tromboxano A<sub>2</sub> e proteínas de adesão como fibronectina, trombospondina, além de fator VIII de Von Willebrand. Esses mediadores juntamente com a trombina ativam a conversão do fibrinogênio à fibrina que compõe a matriz provisória, promovem a agregação plaquetária, a secreção e a formação do tampão de plaquetas interrompendo assim o sangramento. O tecido danificado também participa ao liberar uma lipoproteína conhecida como fator tecidual, que ativa a via de coagulação extrínseca. Os monócitos ativados e as células endoteliais expressam esse fator tecidual na sua superfície e participam da coagulação. A formação de fibrina insolúvel a partir de fibrinogênio solúvel promove a formação do coágulo sobre a lesão (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

A matriz provisória, formada inicialmente por plaquetas agregadas e proteínas de seus grânulos, proteínas da matriz extracelular e do sistema de coagulação, servirá de alicerce para a migração celular, tanto a partir da circulação quanto das regiões adjacentes à lesão. Embebidos nessa matriz, há um gradiente de moléculas com propriedades quimioatrativas com concentração crescente em direção à lesão e que orienta o sentido da migração celular. A vasodilatação local diminui a força de arraste sobre as células circulatórias, que juntamente com a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, permitem a ancoragem e migração de células inflamatórias para o foco (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

As plaquetas também influenciam a lesão por liberar fatores quimiotáticos e fatores que estão relacionados com a cicatrização como o fator 4 de plaquetas, peptídeo ativador de tecido conjuntivo (CTAP-III), Fator de Crescimento Transformador (TGF)  $\alpha$  e  $\beta$  que facilitam o recrutamento de células inflamatórias, factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que estimula a proliferação e a quimiotaxia dos neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e células musculares lisas para o local da lesão (BARRIENTOS et al, 2008).

A quimiotaxia de células inflamatórias para a área danificada é mediada por substâncias liberadas por células como mastócitos, entre estas substâncias estão o fator de necrose tumoral (TNF), histamina, proteases, leucotrienos e citocinas, assim como por fatores de crescimento como PDGF e TGF- $\beta$ . Estes mediadores inflamatórios liberados no local lesionado irão promover vasodilatação, favorecendo a diapedese de leucócitos e extravasamento de líquido. Peptídeos derivados de fibrinogênio, produtos da degradação da fibrina, mas também restos celulares, tais como material nucleico ou ATP, assim como produtos bacterianos promovem atração dos leucócitos, sendo que há predominância inicial de neutrófilos e posterior de macrófagos no foco inflamatório (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

Os neutrófilos são atraídos e aprisionados no plugue de plaquetas em resposta ao PDGF e também fornecem uma citocina pró-inflamatória chave, a interleucina-1 (IL-1), que possui duplo efeito, como uma citocina pró-inflamatória e um estímulo para a proliferação de queratinócitos (CHILDS; MURTHY, 2017).

A participação de neutrófilos na fase inicial da lesão se dá por meio da fagocitose de debris celulares, de microrganismos patogênicos presentes na lesão e remoção de corpos estranhos, além da secreção de colagenase e de várias substâncias antimicrobianas como espécies reativas de oxigênio (EROS), peptídeos catiônicos e proteases. As fases posteriores do reparo tecidual também são influenciadas pelos produtos liberados por neutrófilos, uma vez que EROS estimulam a angiogênese e a fibroplasia (SCHÄFFER; WERNER, 2008).

Os macrófagos são considerados as células reguladoras mais importantes na reação inflamatória, por modularem a resposta local, ao sintetizarem mediadores como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e óxido nítrico (NO), fagocitarem neutrófilos e debris teciduais remanescentes e liberarem fatores quimiotáticos como TGF- $\beta$  para a migração de fibroblastos e células endoteliais, mas também de queratinócitos, promovendo indiretamente, portanto, a formação de matriz extracelular e a re-epitelização (figura 1). Outras importantes substâncias presentes no foco inflamatório e secretadas pelos macrófagos são PDGF, o fator de

crescimento fibroblástico (FGF), e o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

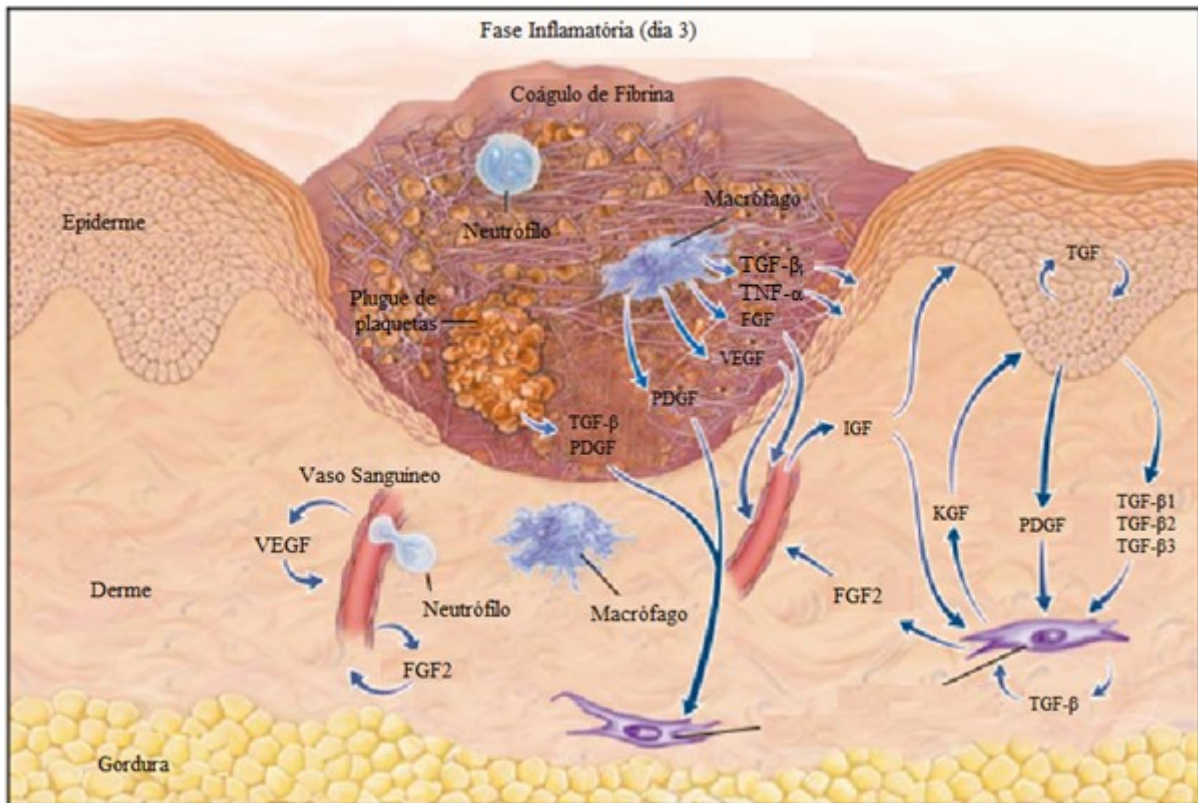


Figura 1. Ferida cutânea três dias após a lesão. Os fatores de crescimento considerados necessários para o movimento celular na ferida são mostrados: TGF - fator de crescimento transformador; TNF – Fator de Necrose Tecidual; FGF - Fator de crescimento de fibroblastos; VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular; PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas; IGF - fator de crescimento semelhante à insulina e KGF - fator de crescimento de queratinócitos (adaptado de SINGER; CLARK, 1999).

Após dois a três dias da lesão, os monócitos aparecem na ferida e se diferenciam em macrófagos. Considera-se que os macrófagos são cruciais para coordenar eventos posteriores na lesão, mas a importância dos neutrófilos e dos macrófagos no reparo da ferida não é completamente compreendida. Na ausência de ambos os tipos de células, o reparo de feridas pequenas ainda pode ocorrer e a resposta de cicatrização é ainda menor (GURTNER et al, 2008).

Monócitos participam do esforço de coordenação entre o sistema imune inato e adaptativo, fagocitam debris, secretam citocinas e proteínas de remodelação da matriz e produzem fatores de crescimento, podendo expressar marcadores de superfície que distinguem múltiplas subpopulações, com espectro inflamatório (clássico) a anti-inflamatório (alternativamente ativado, não clássico ou residente), com cada subpopulação respondendo a

distintas quimiocinas. Nos tecidos, podem persistir como monócitos, repolarizar para uma subpopulação distinta ou ainda se diferenciar em macrófagos, sendo proposto que são recrutados como monócitos inflamatórios, então convertem-se em monócitos anti-inflamatórios e subsequente para macrófagos (OGLE et al, 2016).

Assim como monócitos, macrófagos apresentam diversidade funcional descrita como inflamatória (M1) a anti-inflamatória (M2), de acordo com as mudanças no microambiente, podendo ser polarizado para um fenótipo M1 por citocinas como  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , estímulo microbiano como LPS, o que induz a produção de várias citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e fatores de crescimento como VEGF e FGF2. Macrófagos M2, também conhecidos como alternativamente ativados, podem ser polarizados por IL-4, IL-13, passando a secretar FGF, com consequente deposição de MEC e fechamento da ferida, contribuem para a supressão da inflamação pela secreção de IL-10 (OGLE et al, 2016).

### 2.2.2 Fase Proliferativa ou Fibroblástica

A fase fibroblástica ou de proliferação, considerada a segunda fase do processo de reparação, ocorre dois a dez dias após a lesão e é caracterizada pela migração e proliferação celular, pelo aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno no local. Essas células são os principais componentes do tecido de granulação e após a influência de fatores de crescimento e demais mediadores, derivados principalmente, mas não exclusivamente de macrófagos, são ativados e migram das margens da ferida para o seu centro. O tecido formado é edematoso e frágil, composto por matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno tipos I e III. A neovascularização é essencial nesse estágio por permitir troca de gases e nutrição de células metabolicamente ativas (ECKERSLEY; DUDLEY, 1988).

A restauração do epitélio começa precocemente no processo de cicatrização, mas não é facilmente perceptível até vários dias após a lesão. A epitelização restabelece a barreira externa que minimiza as perdas de líquidos e a invasão bacteriana. O processo de epitelização começa com espessamento da epiderme ao longo das bordas da ferida, onde os hemidesmossomos que unem as células são desfeitos, bem como a laminina da camada basal, permitindo a migração das células epiteliais, facilitada pela expressão de novas integrinas na superfície celular. As células epiteliais são capazes de secretar metaloproteinases (MMP) para quebrar a fibrina, facilitando o processo de migração celular, que ocorre paralelamente à orientação das fibras de colágeno presentes na ferida (MEDEIROS; DANTAS-FILHO, 2016).

A migração e a proliferação de células da epiderme adjacente à borda da lesão (queratinócitos) é o processo de reparação denominado re-epitelização, com formação de novo epitélio estratificado e restauração da epiderme intacta, assim como da membrana basal, caso esteja danificada. A migração de queratinócitos da epiderme ocorre por haver modificação fenotípica, havendo estímulo para migração tanto dos queratinócitos das bordas das feridas quanto dos oriundos dos folículos pilosos, que utilizam receptores superficiais para integrinas para interagir com a fibronectina da matriz provisória, formando a língua migratória (figura 2). No processo denominado “inibição por contato”, há sinalização para que os queratinócitos cessem a migração e multiplicação ao haver complementação da área lesada, levando a que os queratinócitos se reconectem ao substrato adjacente. As células tronco epidérmicas e as dos folículos pilosos da pele são adjacentes, servem como reservatório de queratinócitos para a cicatrização (LI; CHEN; KIRSNER, 2007; FOSSUM, 2007).

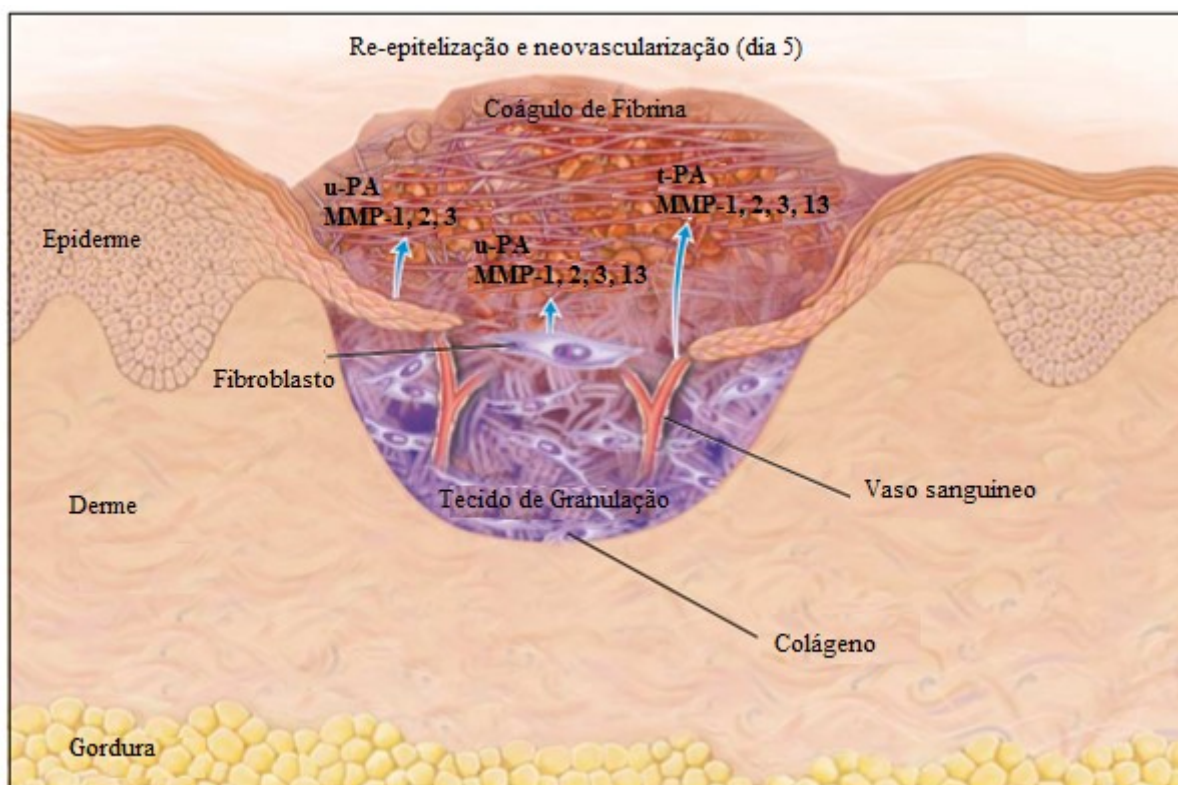


Figura 2. Ferida cutânea cinco dias após a lesão. Vasos sanguíneos são vistos brotando no coágulo de fibrina, assim como células epidérmicas ressurgem na ferida. Proteínas consideradas necessárias para o movimento celular são ressaltadas: u-PA - ativador do plasminogênio do tipo uroquinase; MMP- metaloproteínas de matriz (colagenase 1, gelatinase A, estromelina 1 e colagenase 3, respectivamente) e t-PA - ativador do plasminogênio tecidual (adaptado de SINGER; CLARK, 1999).

Diversas citocinas, por exemplo, liberadas pelos macrófagos e fibroblastos estimulam o processo de angiogênese, assim como a baixa tensão de oxigênio, ácido lático, proteína

secretada ácida e rica em cisteína (SPARC), o FGF, o TGF- $\beta$  e o VEGF, que junto com o fator de permeabilidade vascular exercem atividade sobre as células endoteliais. Destes, o VEGF é o mais importante já que é um potente agente mitogênico para as células endoteliais, induzindo o seu brotamento e a sua migração. O VEGF também atua como um fator de sobrevivência para as células endoteliais por induzir a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl2. Vários tipos celulares como queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, bem como moléculas como óxido nítrico, são capazes de aumentar a expressão de VEGF, além da hipóxia que é o principal indutor desse fator de crescimento (BARRIENTOS et al, 2008). Por exemplo, a aplicação de VEGF<sub>A</sub> sozinho em feridas em um modelo animal de diabetes (em que o reparo de feridas está desregulado) pode normalizar a cura (GALIANO et al, 2004).

Os capilares em brotamento associados a fibroblastos e macrófagos substituem a matriz de fibrina por tecido de granulação, o que constitui um novo substrato para a migração de queratinócitos nos estágios posteriores do processo de reparo. Estes proliferam e restauram a barreira epitelial. Os reguladores positivos mais importantes da angiogênese são o VEGF<sub>A</sub> e o FGF<sub>2</sub> (também conhecido como bFGF) (GURTNER et al, 2008).

A angiogênese por brotamento a partir dos vasos existentes na borda da lesão ocorre inicialmente poucos dias após a lesão, por brotamento de células endoteliais em direção ao foco da lesão, após degradação da membrana basal, com formação de nova rede de capilares, o que permite nutrição e oxigenação local, migração de células inflamatórias e consequente formação de tecido (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Em uma parte tardia da fase proliferativa, os fibroblastos que foram atraídos das bordas das feridas ou da medula óssea, são estimulados por macrófagos e alguns se diferenciam em miofibroblastos. Estes apresentam características contráteis que, ao longo do tempo, aproximam as bordas de uma ferida. Fibroblastos e miofibroblastos interagem e produzem matriz extracelular, principalmente na forma de colágeno, que, em última instância, forma a maior parte da cicatriz madura. Os miofibroblastos descritos inicialmente na década de 70 são caracterizados por expressarem proteínas típicas de células musculares lisas como a  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA). Pela sua habilidade de extensão e retração, são os responsáveis pela força de contração da lesão e pelo aparecimento de contraturas patológicas como aquelas observadas nas cicatrizes hipertróficas (WERNER et al, 2007).

Dunkin e colaboradores (2007) demonstraram através de modelo de ferimento linear com profundidade progressiva em humanos voluntários que a mudança na evolução cicatricial é dependente do fenótipo de fibroblastos, sendo que a porção superficial progrediu para

regeneração enquanto a área mais profunda que 0,56 mm produziu cicatriz, o que foi correlacionado com características dos fibroblastos da derme, que podem ser divididos em superficiais (papilares) ou profundos (reticulares), com respostas muito diferentes a uma agressão.

A contração de feridas é frequentemente avaliada pelo uso de feridas padronizadas no dorso de animais ou por fibroblastos *in vitro* que são fotografados e analisados em tempos variados, entretanto desempenha um papel significativo em animais quando comparados a humanos, o que limita os estudos interespecíficos. Há duas principais teorias a respeito do papel de fibroblastos e miofibroblastos na contração de feridas, sendo sugerido que a contração ocorra pelo encurtamento de miofibroblastos através da  $\alpha$ -actina de músculo liso e que a MEC ao redor seja então remodelada, enquanto que a outra teoria é de que os miofibroblastos exercem tração quando se movem pela MEC. Esta última teoria é apoiada por achados que miofibroblastos não são predominantes na ferida até uma semana depois que a maior parte da contração já tenha ocorrido. A presença de citocinas como o TGF- $\beta$  aumenta a taxa de contração, enquanto outras como o IFN- $\alpha$  a retarda (PATEL et al, 2012).

### 2.2.3 Fase de Maturação ou de Remodelamento

Com a evolução do processo de cicatrização, duas a três semanas após a lesão acentua-se a deposição de colágeno. A maioria das células desaparece (observa-se a apoptose de fibroblastos, macrófagos e células endoteliais ou migram da lesão) formando finalmente a cicatriz. É consenso atualmente, que a resolução completa de uma ferida, somente pode ser considerada depois de concluída a maturação e remodelagem da matriz extracelular. Este processo ocorre lentamente levando muitos meses ou às vezes anos e, mesmo assim, uma cicatriz cutânea completamente madura possui apenas 80% da resistência da pele normal, caracterizando a fase de remodelamento, ou terceira fase do reparo (figura 3) (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).



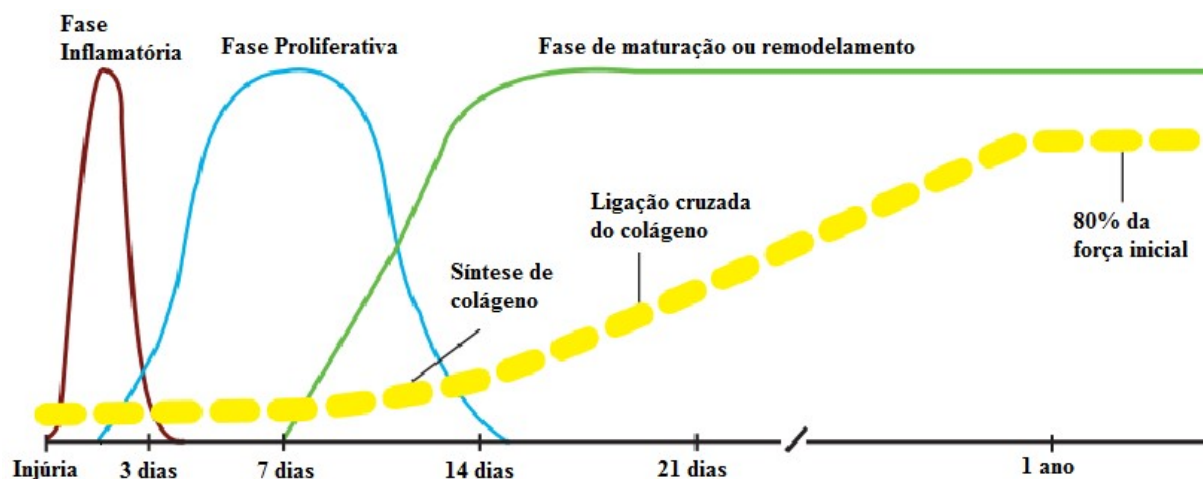


Figura 3. Perfil temporal das fases sincronizadas e ganho de força tênsil na cicatrização de feridas cutâneas. Deve-se notar que a escala de tempo é sugestiva e depende do tamanho e extensão da ferida (adaptado de THEORET, 2008).

O processo de remodelamento envolve etapas sucessivas de produção, lise e orientação das fibrilas de colágeno, que inicialmente tem sua deposição de forma aleatória, orientada na organização da fibronectina, assim como da natureza das tensões aplicadas no tecido. Essas fibrilas, formadas pela agregação de moléculas de colágeno, são rearranjadas de acordo com as fibras de conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes, formando fibras maiores de colágeno que resultam em uma configuração mais regular da cicatriz. A resistência aumenta devido à organização das fibras acompanhar as forças mecânicas atuantes no local (CLARK, 1985).

Ao longo de seis a 12 meses após a lesão, a matriz acelular é ativamente remodelada sendo composta principalmente de colágeno tipo III para uma predominantemente composta de colágeno de tipo I. Este processo é realizado por metaloproteínas que são secretadas por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais e que fortalece o tecido reparado. Deve-se ter em mente que o tecido reparado nunca recupera as propriedades da pele não íntegra (LOVVORN et al, 1999). A fibrina, a fibronectina e outras glicoproteínas são substituídas gradativamente por colágeno, inicialmente do tipo III e após a remodelação, até 90% da cicatriz é constituída por colágeno tipo I (SCHÄFFER; WITTE; BECKER, 2002).

No processo de maturação, as fibrilas de colágeno solúveis se transformam em colágeno insolúvel, altamente resistente. São as ligações químicas covalentes cruzadas as responsáveis diretas pela maturação e ocorrem progressivamente, principalmente nas cadeias laterais de dois aminoácidos, prolina e lisina, após sofrerem hidroxilação, com formação de ligações covalentes inter e intramoleculares, sendo indispensável a presença de ácido

ascórbico, oxigênio e ferro, que são cofatores da hidroxilação da prolina e lisina (MEDEIROS; DANTAS-FILHO, 2016).

Parece improvável que o colágeno tipo III contribua de forma expressiva para o aumento da força tênsil da ferida, por que o grande aumento de resistência é observado em fases tardias da cicatrização, entretanto este tipo de colágeno precoce pode ser importante por estabelecer uma estrutura inicial da ferida e providenciar um arcabouço para os eventos subsequentes de cicatrização (CLORE; COHEN; DIEGELMANN, 1979).

No estudo histopatológico da cicatrização de feridas, vários critérios são considerados para determinar o nível da alteração histopatológica, como profundidade e comprimento da ferida cicatrizada, estratificação epitelial, infiltração de leucócitos e macrófagos, fibroblasto, extensão da formação de elastina, sendo o mais importante o colágeno, que desempenha um papel dominante na manutenção da integridade estrutural da cicatrização de feridas (SUVIK; EFFENDY, 2012).

Dada a complexidade do processo de reparação de feridas, é notável que este raramente se torne incontrolável e que a transformação em neoplasia seja um evento incomum no ambiente da ferida. Para a maioria das lesões, o reparo resulta em um tecido funcional, composto de células (principalmente fibroblastos) e matriz extracelular desorganizada (principalmente colágeno) que é comumente referida como uma cicatriz (GURTNER et al, 2008).

### 2.3 Omento

Descrito por Alagumuthu e colaboradores (2006) como um tecido único, fisiologicamente dinâmico, com imenso potencial terapêutico, o omento possui excepcional versatilidade e conforme citado pelos autores, de fato, claramente foi colocado no abdômen por uma razão, sendo descrito como uma grande dobra de peritônio, uma fina membrana fenestrada com quantidade variável de deposição de gordura, que desce da curvatura maior do estômago como um avental em extensão variável sobre as alças intestinais e por limitar a propagação de infecções intraperitoneais, movendo-se e isolando o local.

O omento é um órgão abdominal, com características imunológicas e regenerativas, composto pelo omento maior, omento menor e bursa omental e com uso em cirurgias variadas (HOSGOOD, 1990). Certos atributos especiais do omento favorecem suas inúmeras aplicações na prática cirúrgica do dia-a-dia. Tem sido descritas nos últimos anos funções variadas como marcadas atividades de angiogênese, fibrose, de células tronco e do sistema

imune, que juntas aceleram a cicatrização de feridas, promovem a neovascularização e limitam a infecção. É um órgão altamente vascular, com rica fonte de fatores angiogênicos que promovem o crescimento de vasos sanguíneos em qualquer tecido que seja colocado próximo e, ainda, o potente sistema linfático do omento pode absorver enormes quantidades de fluidos do edema e remover resíduos metabólicos e substâncias tóxicas (MEZA-PEREZ; RANDALL, 2017; LITBARG et al, 2007; ALAGUMUTHU et al, 2006).

Koppe e colaboradores (2014) relataram o rápido aumento de tumores no tecido do omento, devido a suas características de drenagem e de imunidade da cavidade abdominal, além do fornecimento de energia pelos adipócitos em grande escala para atender à demanda elevada das células metastáticas. Tumores primários do omento são bastante incomuns, entretanto este órgão é o local mais comum de metástase peritoneal para alguns tumores, incluindo os gastrointestinais e os carcinomas ovarianos. Assim, o omento é um ambiente ideal para o crescimento de células tumorais metastáticas, sendo frequentemente removido como parte das ressecções por neoplasias em vários órgãos intra-abdominais.

### 2.3.1 Anatomia, histologia e fisiologia

Derivado de células mesoteliais e conectado ao baço, estômago, pâncreas e ao cólon, o omento é um tecido adiposo visceral, com funções variadas a serem desempenhadas na cavidade abdominal, incluindo depósito de gordura, intensa vascularização local, adesão, além de papel na imunidade peritoneal (WILKOSZ et al, 2005) e com ampla capacidade de movimentar pela cavidade abdominal, atenuar e ocluir locais de inflamação, característica descrita já em 1906 (MORRISON, 1906 apud MEZA-PEREZ; RANDALL, 2017).

O aspecto macroscópico do omento depende da espécie, da idade do indivíduo, estado nutricional e seu estado de estimulação, como por exemplo, em situações patológicas. No homem e em animais, o omento tem a mesma textura, revestimento mesotelial e conteúdo celular, com discretos nódulos opacos no tecido transparente. Em neonatos e jovens, o omento possui pouco tecido adiposo, que aumenta conforme a idade. Constituído por uma rede de trabéculas de tecido conectivo, o omento maior recobre todo o intestino e contém uma rede rica de vasos sanguíneos finos com arteríolas e vênulas pareadas que se anastomosam, passando centralmente na trabécula e formando um sistema de múltiplos arcos comunicantes. Nas malhas entre as trabéculas, finas membranas de tecido conectivo estão interpostas (figura 4) (LIEBERMANN-MEFFERT, 2000).

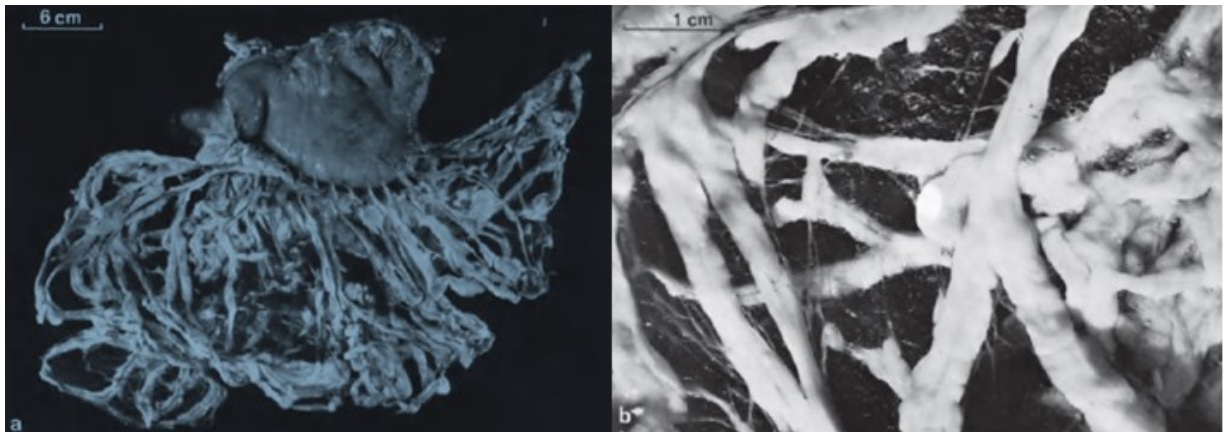


Figura 4. Omento de cão adulto, constituído de rede de trabéculas teciduais contendo um grande número de vasos que formam arcos comunicantes, com quantidade variável de tecido adiposo infiltrado a. visão macroscópica, b. imagem em pequeno aumento (adaptado de LIEBERMANN-MEFFERT; WHITE, 2012).

Como consequência das rotações parciais do estômago em desenvolvimento, o arranjo original do mesogástrio torna-se alterado. Durante a rotação do estômago para a esquerda, o mesogástrio dorsal alonga-se e também é atraído para a esquerda, formando uma dobra dupla em forma de bolsa, envolvendo uma cavidade referida como bursa omental, passando a ocupar uma posição entre as vísceras abdominais e a parede abdominal. Nesta fase de desenvolvimento, a estrutura, que é referida como o omento maior, consiste de uma folha superficial e outra profunda, ambas dobras de peritônio, sendo que a bolsa omental comunica-se com a cavidade peritoneal através de uma abertura, o forame epiplóico. O mesogástrio ventral dará origem ao omento menor (figura 5) (McGEADY et al., 2017).

Os dados anatômicos detalhados sobre o omento canino e felino e seu suprimento vascular não são amplos como em medicina humana, consequentemente, as técnicas cirúrgicas usadas nesses estudos exploratórios, bem como aquelas posteriormente aplicadas em animais de companhia, muitas vezes dependem indevidamente de dados humanos (DOOM et al., 2016). Em ratos e camundongos, o omento é pequeno e geralmente sobre o estômago, em estrutura semelhante a um saco transparente, tendo seus depósitos de gordura periféricos e com grandes áreas parecendo avasculares (LIEBERMANN-MEFFERT; WHITE, 2012).

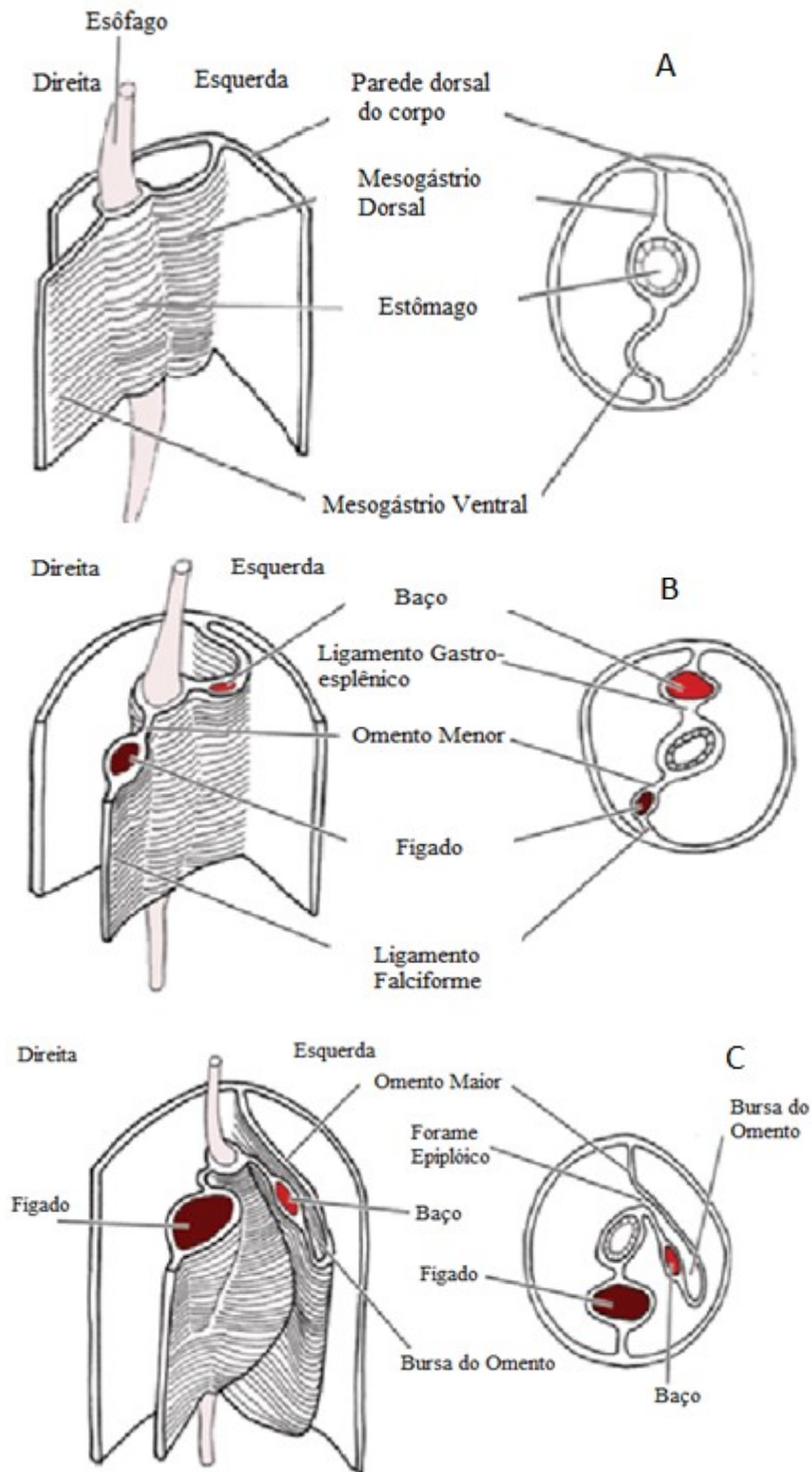


Figura 5. Vistas ventro-laterais e cortes transversais através da região abdominal cranial de um embrião canino. A. Estômago em desenvolvimento mostrando a posição do mesogástrio dorsal e do mesogástrio ventral. B. Início da rotação gástrica para a esquerda e posição do baço no mesogástrio dorsal e fígado no mesogástrio ventral. C. Alongamento do mesogástrio dorsal e formação da bursa omental. O crescimento do fígado no mesogástrio ventral resulta na formação do omento menor dorsal ao fígado e do ligamento falciforme ventralmente (Adaptado de McGEADY et al., 2017).

Nos cães, o omento maior é notavelmente grande e se estende como uma estrutura dobrada do estômago até a bexiga, cobrindo as alças intestinais ventral e bilateralmente, originando-se da curvatura maior do estômago, estendendo-se do fundo gástrico ao piloro e continuando na parte proximal do duodeno, enquanto a outra porção é fixada ao lobo esquerdo do pâncreas e continua craniodorsalmente para se unir à parede abdominal dorsal. A borda cranial esquerda da porção bursal é anexada ao hilo do baço, no entanto, a extremidade ventral do baço permanece desapegada do omento. O omento menor é pequeno e relativamente simples, abrange a área revestida pelo fígado, a curvatura menor do estômago e a parte cranial do duodeno e com base no local da fixação, subdivide-se no ligamento hepatogástrico e no ligamento hepatoduodenal, sendo por este a passagem de estruturas como a veia porta, a artéria hepática e o ducto biliar comum (DOOM et al., 2016). A tabela 1 demonstra as variações inter-espécies no tamanho do omento em relação ao peso corporal:

Tabela 1. Tamanho do omento de diferentes espécies adultas em largura e comprimento.

Espécie	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Peso Corporal (kg)
Homem	25 ± 11	33 ± 13	-
Cão	39,7 ± 7,0	34,8 ± 5,0	23,2 ± 1,2
Gato	24,8 ± 6,5	19,5 ± 4,1	-
Coelho	7,6 ± 4,2	10,9 ± 3,2	2,8 ± 0,8
Cobaia	6,8 ± 1,3	8,0 ± 1,8	0,8 ± 0,6
Rato	2,8 ± 0,3	5,2 ± 2,1	0,3 ± 0,4
Camundongo	2,2 ± 0,2	2,6 ± 0,2	0,03 ± 0,03

\* - (adaptado de LIEBERMANN-MEFFERT; WHITE, 2012).

O principal suprimento sanguíneo da porção bursal é derivado do arco arterial gastroepiplóico. Essa anastomose entre as artérias gastroepiplóicas direita e esquerda está localizada na parede superficial da porção bursal, paralela à grande curvatura do corpo gástrico e do piloro. As artérias gastroepiplóicas têm uma origem diferente, sendo a direita localizada na região pilórica e origina-se da artéria gastroduodenal, que é um ramo da artéria hepática, enquanto a esquerda origina-se da artéria esplênica, que surge da artéria celíaca e está localizada na parede profunda do omento maior, no qual corre paralela ao lobo pancreático esquerdo (DOOM et al., 2016). A drenagem venosa é paralela às artérias e termina no sistema porta (figura 6). Os vasos linfáticos do omento se originam de evaginações

endoteliais, formando uma delicada rede interconectada, que drena para os nódulos linfáticos subpilórico e esplênico (LIEBERMANN-MEFFERT, 2000).

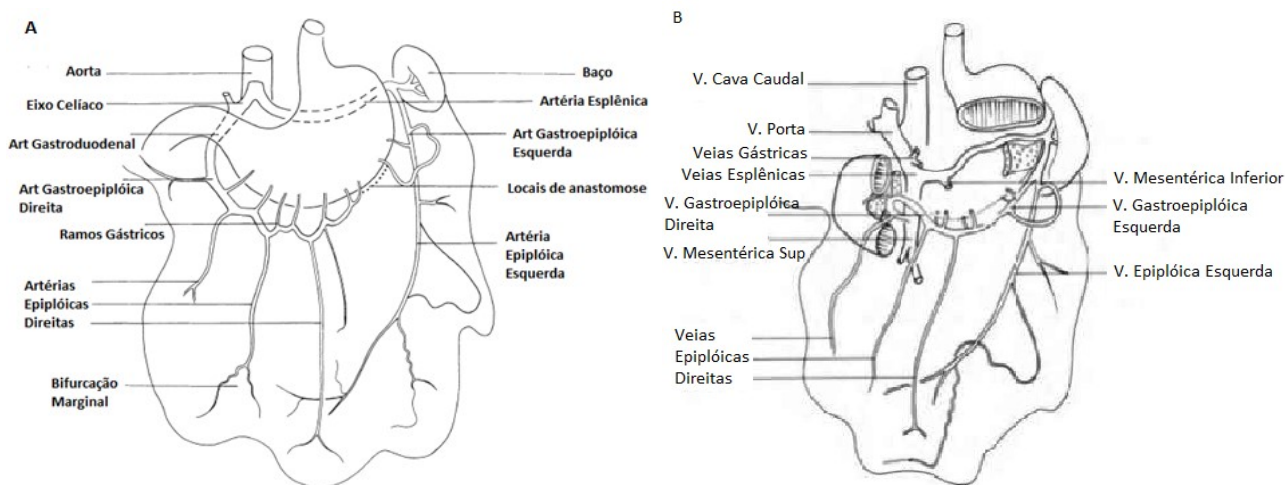


Figura 6. Nomenclatura, origem e distribuição individual das artérias (A) e veias (B) omentais no homem. O arco arterial gastroepilóico muitas vezes não é completo (adaptado de LIEBERMANN-MEFFERT; WHITE, 2012).

O omento possui agregados de leucócitos que se assemelham a folículos de tecidos linfoides secundários, tendo recebido a denominação de “*milky spots*” (MS) por sua aparência esbranquiçada em meio ao amarelo da gordura do omento, quando descritos pela primeira vez em 1874, por um anatomista francês (RANVIER, 1874 apud MEZA-PEREZ; RANDALL, 2017). Os MS têm uma ampla faixa individual entre as dimensões macroscópica e microscópica, podendo variar no homem entre 0,5 a 3,5 mm<sup>2</sup>, maior que em animais, onde variam de 100 μm<sup>2</sup> a 3,0 mm<sup>2</sup> (LIEBERMANN-MEFFERT, 2000).

A estrutura do MS é uma coleção de leucócitos embebidos em adipócitos, abaixo da camada mesotelial. Linfócitos B formam o centro, enquanto que macrófagos e células dendríticas tendem a se acumular ao redor, podendo haver linfócitos T agrupados ao redor dos vasos ou misturados entre os linfócitos B. Células e antígenos podem passar passivamente através do fluxo de líquidos ou serem apresentados por células apresentadoras (figura 7) (MEZA-PEREZ; RANDALL, 2017).

Agregados linfoides similares aos MS foram demonstrados em outros tecidos adiposos, sendo descritos como grupos linfoides associados a gordura (Fat-Associated Lymphoid Clusters – FALCs), encontrados em pericárdio, mediastino, pleura, mesentério, entre outros locais. Possuem funções similares, entretanto a frequência difere, dependendo das interações celulares existentes no local (BÉNÉZECH et al, 2015).

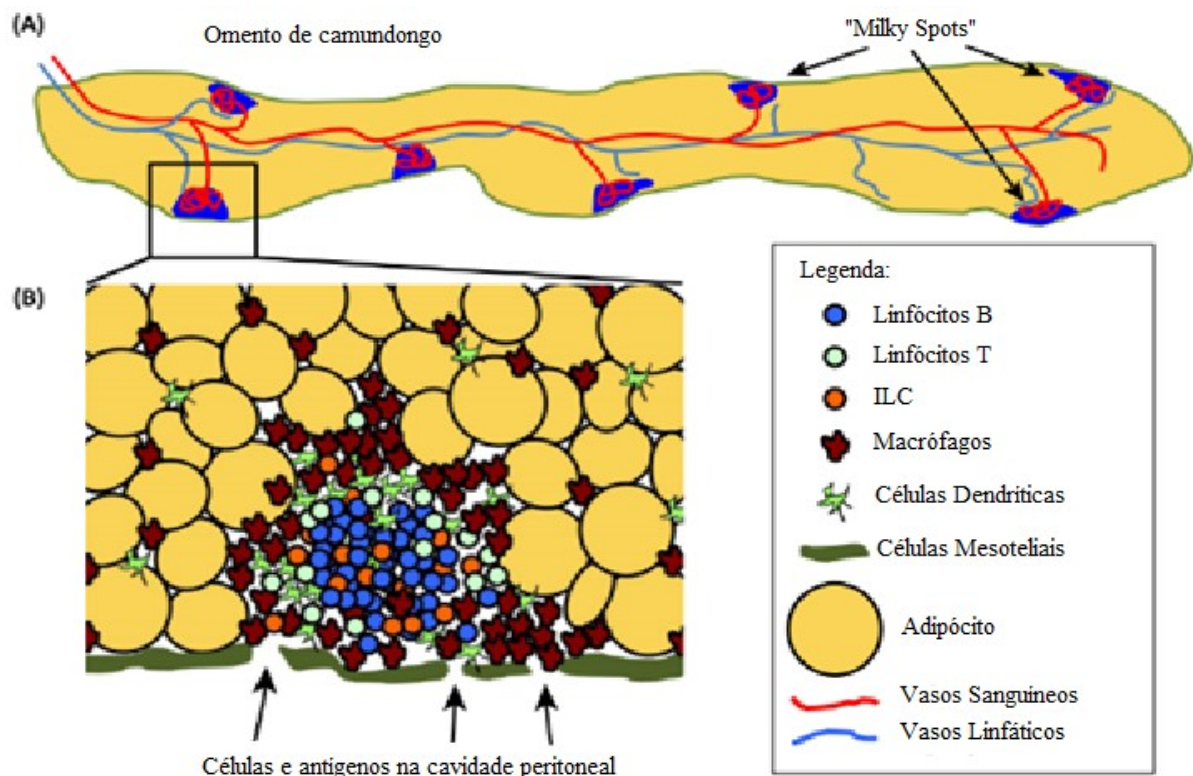


Figura 7. Estrutura dos “*Milky Spots*” (MS) no omento. (A) Esquema do omento inteiro em camundongos. (B) Estrutura do MS que são coleções soltas de leucócitos embutidos entre adipócitos logo abaixo da camada mesotelial. Os linfócitos B formam um *cluster* central, enquanto os macrófagos e as células dendríticas tendem a acumular-se em torno do MS e também são encontradas individualmente em todo o omento. Linfócitos T e células linfóides inatas (ILC) podem ser misturados com as células B ou podem agrupar-se em torno dos vasos sanguíneos. Células e antígenos são passivamente coletados da cavidade peritoneal através de fenestrações no mesotélio ou pode ser ativamente transportada por células fagocíticas como macrófagos (adaptado de MEZA-PEREZ; RANDALL, 2017).

O fluido peritoneal é constantemente drenado da cavidade abdominal através do omento, carregando células livres, antígenos e partículas, tendo como resultado, a ativação das células inflamatórias dos MS, no desempenho da função como filtro, iniciando uma resposta imune a qualquer antígeno ou patógeno na cavidade peritoneal. Além disso, o omento fornece neutrófilos e macrófagos para a cavidade peritoneal, derivados dos “milky spots”, que viabiliza ambiente e fatores de crescimento para proliferação e maturação destas células, o que faz com que o omento participe como principal órgão de defesa local em casos de peritonite (figura 8) (PLATELL et al, 2000).

Importante tanto na imunidade inata quanto na adaptativa da cavidade peritoneal, o omento tem seus MS aumentados de tamanho e número em situação de resposta inflamatória



a antígenos peritoneais, em que há rápida migração de macrófagos para o omento, seja induzida por partículas como bactérias, LPS bacterianos ou até estímulos inertes como polidextrano. A expansão do MS, em torno de 15 a 20 vezes, é acompanhada da produção de fatores e citocinas, como fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), que aumentam de duas a quatro vezes, além da migração de células inflamatórias oriundas do sangue (MEZA-PEREZ; RANDALL, 2017; LITBARG et al, 2007).

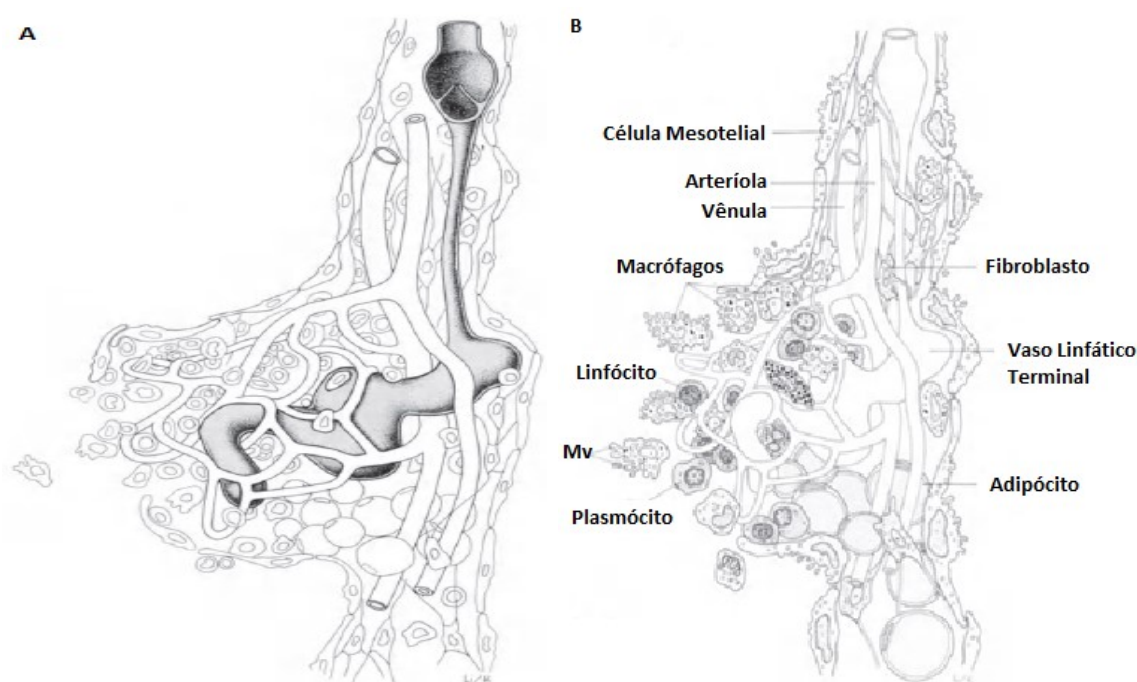


Figura 8. Diagramas ilustram as estruturas e a composição celular de um “milky spot” ativado. Dentro do “milky spot” e em seus arredores, as células linforreticulares estão aglomeradas, estando em contato próximo com os vasos sanguíneos e linfáticos (A). As lacunas no mesotélio permitem comunicação entre “milky spot” e a cavidade peritoneal (B). Mv - macrófagos ativados migratórios. Estruturas e células estão fora de escala (adaptado de LIEBERMANN-MEFFERT; WHITE, 2012).

Huyghe e colaboradores (2015) pesquisaram a estrutura microscópica do omento canino, relatando não terem sido evidentes os agregados de células imunes, conhecidos como “milky spots”, sendo as demais características macroscópicas e microscópicas similares ao omento humano. Importante ressaltar que os animais utilizados no experimento eram saudáveis e que limitadas células leucocitárias foram vistas no tecido conectivo de regiões translúcidas, além de ser virtualmente inexistente nas regiões ricas em adipócitos. Descrição oposta foi feita por Liebermann-Meffert; White (2012), que afirmaram haver numerosos MS em todas as espécies, com aumento em determinadas condições no abdômen, podendo ainda

haver variação individual. A presença de grandes depósitos de gordura abdominal, infiltrada no omento, dificulta sua visualização.

Agalar et al (1997) propuseram que a remoção do omento prejudica os mecanismos de defesa peritoneal. Na peritonite experimental induzida em ratos wistar, descobriu-se que a omentectomia reduz a sobrevivência e influencia uma série de mecanismos de defesa peritoneal, tais como a contagem total de células intraperitoneais, com diminuição principalmente de macrófagos. Há também uma redução na quimiotaxia dos neutrófilos, embora sua atividade fagocítica apareça inalterada.

Pesquisadores mostraram que células do omento podem ser ativadas na presença de corpos estranhos injetados na cavidade peritoneal de ratos e que há aumento de tamanho e na massa do omento, com predomínio de células não adiposas. Estas células estromais são ricas em fatores de crescimento como FGF e VEGF e expressam marcadores de células-tronco, sugerindo fortemente a habilidade potencial do omento de regeneração tecidual. Ao entrar em contato com o corpo estranho, o omento se expande rapidamente para encapsular o objeto como se para proteger os órgãos internos adjacentes. (LITBARG et al, 2007). Estes fatores de crescimento favorecem o processo de neovascularização, o que permite que o omento forneça suporte vascular aos tecidos isquêmicos ou inflamados, restaurando suas funções ou sua cicatrização (PLATELL et al, 2000).

Mais pesquisas revelaram que o aumento da perfusão vascular no local do enxerto omental se deve a níveis elevados de VEGF e possivelmente também à presença de FGF. Quando incubados em hipóxia, o tecido omental aumenta a quantidade de VEGF, que é conhecido por desempenhar um papel significativo na angiogênese, ajudando a corrigir a hipoperfusão do tecido realocado. O implante de omento em modelos de ratos demonstrou também a angiogênese mediada por FGF. A angiogênese é importante para a sobrevivência e o tecido omental tem bases moleculares para essa revascularização (MAZZAFERRO et al., 2017).

Shah e colaboradores (2012) propuseram que o omento é mais que um agrupamento de adipócitos associados com órgãos linfóides secundários, funcionando mais como um potente órgão imunorregulatório, por demonstrarem que células omentais (OC) ativadas podem suprimir a proliferação de linfócitos T, sendo denominadas Células Supressoras Derivadas Mielóides (MDSC).

Além da supressão promovida pelas MDSC, a presença de células-tronco mesenquimais (MSC) modulam o local de inflamação, através da secreção de vários fatores,

incluindo alguns com propriedades imunossupressoras, além de fornecerem um microambiente regenerativo para tecidos lesionados limitarem a área de dano e montarem uma resposta regenerativa (SHAH et al, 2012).

### 2.3.2 Uso em cirurgias

Materiais biológicos, empregados como curativo oclusivo, têm sido recomendados por vários investigadores por possuírem propriedades antibacteriana e analgésica, por acelerarem a formação de tecido de granulação e epitelização e propiciarem barreira à invasão bacteriana, características admitidas como benéficas para a cicatrização (PREVEL et al. 1995 e SAI; REDDY; BABU, 1995).

Anatomicamente, o omento e o seu arranjo vascular possibilitam que sejam alongados em um pedículo vascular, exteriorizado ou utilizados livres com o uso de técnicas microvasculares para vários procedimentos intra-abdominais e extra-abdominais. O suprimento arterial e venoso ao omento é derivado dos ramos dos vasos gastroepiplóicos direito e esquerdo ao longo da curvatura maior do estômago e sua utilização, juntamente com o desprendimento do omento do cólon transverso, permite o desenvolvimento de um retalho pediculado omental vascularizado em humanos (ALAGUMUTHU et al, 2006).

O uso mais comum do omento é como um complemento à cirurgia gastrointestinal, em que é frequentemente utilizado em torno dos locais de anastomose, pois preenche pequenos espaços entre as suturas e fornece uma boa fonte de vascularização e células inflamatórias para o reparo. Vazamento anastomótico é a complicação mais temida na cirurgia do trato digestivo, principalmente em esôfago, mas também reduz a hemorragia intra-abdominal e infecção em órgãos como baço e fígado (ALAGUMUTHU et al, 2006).

Seu uso em medicina veterinária e humana foi descrito em tratamentos variados como de feridas em extremidades distais de cães (ROA et al., 1999), para feridas refratárias por injúria elétrica, avulsão do escalpe, úlceras por radiação com severa infecção e necrose tecidual em humanos, na forma de retalho pediculado ou como enxerto livre com anastomose (SHEN; SHEN, 2003), em defeitos de preenchimento, zonas de elevado risco de infecção pós-operatório, na reconstrução de paredes tanto abdominal como torácica, particularmente quando há risco de isquemia (KOPPE et al., 2014), fechamento de hérnias abdominais e defeitos diafragmáticos, tratamento de cistos e abscessos prostáticos, hepáticos e pancreáticos e em cirurgias vesicais, com a finalidade de impedir aderências ou vazamentos (PAVLETIC, 2018).

Em equinos, a formação de aderências intra-abdominais pós-operatórias é uma complicação frequente de celiotomias exploratórias na espécie e a omentectomia foi proposta como forma de minimizar a sua formação e conseqüente episódios de síndrome cólica no pós-cirúrgico. Kuelbelbeck et al (1998) propuseram que a omentectomia minimizaria a formação de aderências abdominais após cirurgias abdominais, em que 21% (4/19) dos equinos que sofreram omentectomia necessitaram de uma relaparotomia (reintervenção de uma laparotomia, diretamente ligada à primeira cirurgia) por formação de aderências, enquanto 60% (15/25) dos equinos do grupo que não sofreu o procedimento durante a cirurgia abdominal necessitou de nova cirurgia devido a dor abdominal por formação de aderências. Tais dados são controversos e Blikslager e colaboradores (2017) relatam raramente haver problemas clínicos por aderências omentais e descrevem o sucesso em utilizar o omento em suturas intestinais, com o objetivo de prevenir a formação de aderências entre alças e sugere ainda que a possibilidade de estrangulação envolvendo o omento aderido deve ser avaliado, em comparação aos benefícios do aumento de vascularização local do pedículo omental.

Goldsmith (1968) utilizou o omento para aumentar a vascularização do miocárdio, comparando enxertos livres sem anastomose e retalhos pediculados, descrevendo que uma pressão sanguínea oriunda de um enxerto pediculado seria benéfica para o miocárdio isquêmico, entretanto a tração do pedículo na cavidade abdominal, principalmente sobre o estômago, poderia ser um inconveniente, o que não foi observado nos cães operados no estudo com o uso de retalhos pediculados. Concluiu que o omento pediculado parece ter resultados superiores ao omento livre para fins de revascularização miocárdica.

O omento pode fornecer uma fonte de circulação para a área, não apenas para melhorar a cicatrização, mas para potencialmente servir como superfície vascular para a aplicação de enxerto de pele. A principal limitação no uso do omento é sua relativa fragilidade e falta de “volume” para fechar defeitos maiores. A superextensão do retalho omental pode resultar em comprometimento circulatório para a porção mais distal desse tecido. No entanto, dentro do seu arco normal de rotação ou avanço, o omento pode ser reunido ou dobrado para melhorar seu volume para defeitos envolvendo a parede abdominal ou o diafragma (PAVLETIC, 2018). Há muito tempo se reconhece que o omento maior ajuda fortemente na revascularização do tecido e promove a atividade angiogênica nas estruturas adjacentes às quais é aplicado. Os materiais angiogênicos obtidos do omento são abundantes (AZARI et al, 2012).

Treinamento e equipamentos especializados são necessários para realizar com sucesso as transferências microvasculares. O equipamento necessário inclui microscópio cirúrgico com boa ótica, material de sutura 9-0 a 11-0, braçadeiras vasculares atraumáticas, microtesouras, pinças e porta-agulhas oftálmicas, dilatadores de vasos e dispositivos de acoplamento. É necessário que os vasos do retalho sejam grandes o suficiente e os vasos de tamanho similar estejam disponíveis próximo ao leito da ferida (FOSSUM, 2007).

O tamanho do omento não apenas fornece uma grande quantidade de tecido para transferência, mas também permite que o cirurgião deixe a maioria do tecido no lugar, no caso de enxertos livres, diminuindo a morbidade no local doador. Sua vasculatura é passível de extensa dissecação, resultando em um retalho pediculado muito alongado e móvel, entretanto a laparotomia para coleta do enxerto ou retalho omental tem sido associada a maior morbidade, como a ocorrência de ileus, herniação, infecção intra-abdominal, trombose e embolismo, em humanos (MAZZAFERRO et al., 2017).

Muitos cirurgiões observaram a habilidade do omento de aderir a corpos estranhos intra-abdominais, com a possível desvantagem de, dentro de sete dias, drenos e cateteres colocados na cavidade abdominal de cães serem rodeados e ocluídos pelo omento, levando a problemas em pacientes que requerem colocação de cateteres de longa duração (PLATELL et al, 2000).

Com relação à hemostasia, o omento reduz a hemorragia profusa e incontrolável pela pressão. Isso foi atribuído à capacidade omental de acelerar a ativação da protrombina, aumentando a concentração de um fator tecidual hemostático no omento que causa a rápida mudança do fibrinogênio para a fibrina (LIEBERMANN-MEFFERT, 2000).

Com o tempo, as opções de seleção de retalhos de tecido livres foram padronizadas devido à experiência coletiva e certos tecidos reduziram ou perderam suas indicações de uso, devido à outras variedades de retalhos que surgiram, como cutâneos e músculo-cutâneos. Este foi o caso para o uso do omento, que após trinta anos da primeira operação de transferência de tecido livre omental, houve cada vez menos casos relatados. A cirurgia vascular moderna possibilitou novos relatos de preservação das extremidades isquêmicas usando anastomoses vasculares associadas a transferências de tecidos livres, revitalizando o uso do omento e salvando pacientes com feridas destrutivas pós-traumáticas de grandes amputações (CIUCE et al, 2003).

#### 2.3.2.1 Retalhos omentais

Retalhos de omento vêm sendo utilizados em procedimentos cirúrgicos em diversos órgãos e tecidos desde o século XIX, com descrições em sistema gastrointestinal, vascular, nervoso e cirurgias reconstrutivas, como de parede abdominal, pescoço e cabeça (PLATELL et al, 2000).

A utilização do retalho omental em cirurgias em extremidades apresenta vantagens como a flexibilidade do tecido, por ser facilmente moldável, possuir grande área e fornecer vascularização intrínseca capaz de aumentar o fluxo sanguíneo em determinada região, o que acarreta aumento local da tensão de oxigênio e de fatores humorais e conseqüentemente acelera a cicatrização e diminui a ocorrência de infecções (FERRIGNO et al, 2010). Na cirurgia de cães e gatos considera-se que pode ainda ser utilizado em lesões faciais ou de extremidades, caso seja realizado o alongamento do omento (figura 9) ou se microcirurgia vascular for utilizada (FOSSUM, 2007).

O retalho omental pode ser usado para cobrir defeitos em tecidos moles, contribuir para a circulação e drenagem, potencializar a cicatrização, controlar a formação de aderências e combater a infecção. Embora menos duráveis que retalhos musculares, eles estimulam a formação de tecido de granulação que permite o fechamento precoce da ferida com retalhos de pele ou enxertos. Retalhos omentais são especialmente úteis para feridas crônicas que não cicatrizam (FOSSUM, 2007).

Dois métodos podem ser utilizados para mobilizar o omento, sendo um envolvendo a criação de um pedículo vascular englobando ambas as artérias epiplóicas direita e esquerda e o outro método envolve liberar o omento do pâncreas e então prolongá-lo com uma incisão em forma de L invertido (FOSSUM, 2007). Ross; Pardo (1993) descreveram a técnica de prolongamento do omento maior no cão, baseados na vascularização do omento e comprovaram a viabilidade vascular do retalho.

A utilização de transposição do omento, através de pedículo vascular ligado ao estômago, com preservação da artéria gastroepiplóica, para tratamento de linfedema em membros de pacientes humanos foi descrito por Goldsmith; De Los Santos; Beattie (1967), com a finalidade de aumentar a drenagem através de vasos linfáticos e vascularização rica do omento. A melhora clínica e estética dos pacientes foi considerada satisfatória.

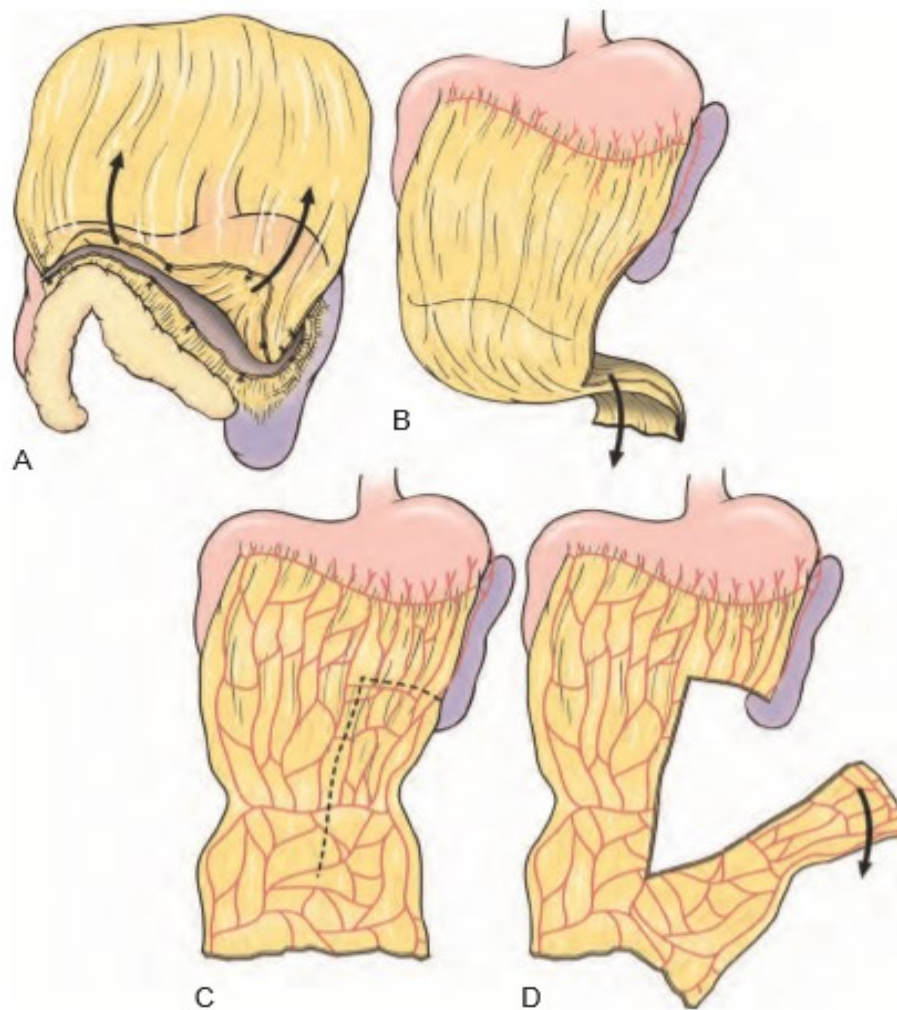


Figura 9. Extensão omental. A, Omento maior exteriorizado, retraído cranialmente para liberá-lo de seus anexos pancreáticos. B, Folha dorsal do omento estendida caudalmente. C, Incisão em forma de L invertido apenas caudal ao ligamento gastroesplênico. D, Lado esquerdo girado caudalmente para alcançar a extensão total (adaptado de FOSSUM, 2007).

A utilização de retalhos de omento, juntamente com enxertos de pele tem por finalidade promover os benefícios citados por Fossum (2007), assim como permitir o fechamento precoce da lesão. Ferrigno e colaboradores (2010) descreveram técnica com o uso de retalho de omento para indução de vascularização e promoção da consolidação em lesão óssea distal em membro de cão (fratura óssea de tíbia e fíbula de uma cadela de 10 anos de idade), com histórico de duas intervenções cirúrgicas anteriores e quadro clínico de união retardada no local da fratura. A cobertura do foco da fratura com retalho de omento tunelizado e coberto com enxerto cutâneo em malha promoveu a consolidação óssea em oitenta dias.

Goldsmith; Chen; Duckett (1973) descreveram ainda o uso de retalhos omentais para lesões em sistema nervoso central em cães, com a finalidade de promover a revascularização e remover edema (figura 10).

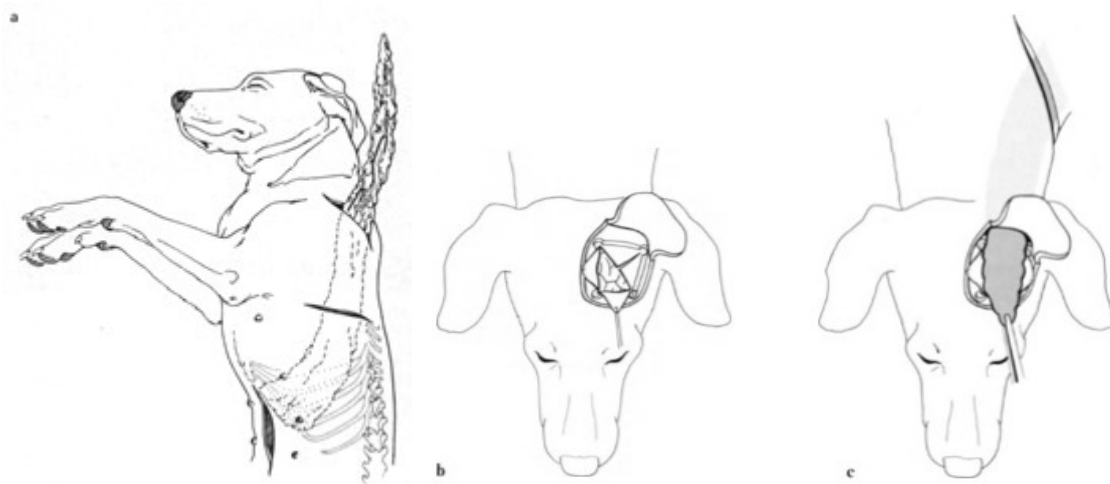


Figura 10. Utilização de retalho omental pediculado em revascularização do cérebro. a. Colocação do omento em um túnel subcutâneo ao longo do tórax. O omento será estendido ao longo do pescoço até o crânio. b. Craniotomia. c. Omento sendo mobilizado para recobrir defeito no crânio (adaptado de GOLDSMITH; CHEN; DUCKETT, 1973).

Em felinos, o processo cicatricial possui particularidades que incluem doenças infecciosas, presença de corpos estranhos, doenças sistêmicas, terapias imunossupressivas ou movimento excessivo local (BOHLING; HENDERSON, 2006). Feridas que não cicatrizam em áreas de movimento excessivo, como os espaços axilares e inguinais, são comuns, especialmente em gatos. O fechamento convencional geralmente resulta em falha e a transferência de retalho pediculado omental tem sido usada com sucesso para melhorar a cicatrização dessas feridas (KRAHWINKEL; BOOTHE, 2006).

O uso do omento como coadjuvante na cicatrização cutânea em gatos foi descrito por Falcão e colaboradores (2016), que relataram o uso de retalho pediculado para o tratamento de ferida crônica na face externa da coxa de um gato que havia sido submetido a cirurgia de fratura de fêmur, com deiscência de sutura. A omentalização da lesão crônica mostrou excelente resultado, com fechamento total da lesão, onde antes haviam sido tentados tratamentos conservadores diversos, sem resultados.

Em um outro estudo com felinos e enxertos pediculados, utilizados juntamente com retalhos cutâneos, a omentalização de feridas axilares crônicas em gatos pareceu ajudar a cicatrização, sendo relacionado pelos autores ao aumento da vascularização através de fatores angiogênicos liberados pelo omento. Outro fator pode ter sido a capacidade do omento de absorver o fluxo de tecido e ainda preencher o espaço morto, o que também pode ter desempenhado um papel diminuindo a profundidade da lesão na axila. O omento fornece um dreno permanente e melhor capacidade de resistir à infecção (LASCELLES; WHITE, 2001).



Foi descrito, por Mazzaferro e colaboradores (2017), que em todos os casos pediculados, o retalho omental precisa de uma "hérnia obrigatória" na fáscia abdominal, no diafragma ou na região inguinal, podendo ser uma desvantagem em comparação com o retalho livre omental.

### 2.3.2.2 Enxertos omentais livres

Existe uma ampla gama de retalhos livres que podem ser usados para a reconstrução da cobertura cutânea e dos tecidos moles em lesões complexas, mas nenhum deles apresenta as muitas vantagens bioquímicas e anatômicas do omento. Suas vantagens bioquímicas incluem secreção de fatores de crescimento, produção de substâncias neuroquímicas e a presença de interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8) e interferon gama. Essas características bioquímicas oferecem a vantagem de grande proteção imunológica e ação bactericida na presença de infecções agudas e crônicas, maior capacidade de revascularização do tecido isquêmico e maior produção e absorção de fluidos. Relata-se que, na cirurgia humana, as vantagens conferidas pelo retalho livre omental incluem uma grande área, vasos sanguíneos calibrosos e consistentes que facilitam o reparo microcirúrgico, grande plasticidade que permite melhor modelagem do retalho no local reconstruído, persistência da flexibilidade que evita cicatrizes e contração, além de baixa demanda metabólica que permite um longo tempo de isquemia (IGLESIAS et al., 2014).

Freeman (1916) descreveu o uso de enxertos omentais livres na cirurgia abdominal, destacando a capacidade do tecido do omento se fixar em superfícies inflamadas e lesionadas, envolvendo-as, mesmo quando utilizado na forma livre. Destacou ainda a vantagem do uso do omento livre na cavidade abdominal, com a ausência de formação de encarceramentos ou tração prejudicial no trato gastrointestinal. A prevenção de aderências indesejáveis, o reforço de suturas gastrintestinais, a substituição de porções do peritônio, o controle de hemorragias em baço, fígado e pâncreas foram indicações de uso propostas. Descritas como precauções a serem observadas no uso do omento incluem coleta do enxerto na borda livre da bursa omental, a retirada de material apenas necessário para cobrir a área lesionada, evitando o excesso de tecido no local de implante, assim como a fixação do enxerto com pontos a fim de evitar seu deslocamento.

O uso de enxertos omentais livres sem anastomose foi descrito também por Thompson; Pollock (1945), que utilizaram cães para cirurgias diversas no tórax, como incisões no parênquima pulmonar, utilização em coto após a excisão parcial de lobo

pulmonar, em pleura, esôfago e cirurgia vascular na veia cava e na aorta, concluindo que o seu uso livre é viável nas cirurgias propostas, citando seus efeitos no foco da lesão como hemostasia, reforço das linhas de sutura e substituição de defeitos. O uso de enxerto autólogo foi relatado como uma desvantagem pela necessidade de abertura da cavidade peritoneal. Vineberg; Pifarre; Mercier (1962) utilizaram o enxerto de omento livre para revascularização de miocárdio, relatando ter ocorrido conexões vasculares entre as duas superfícies em 20 dias.

O omento foi o primeiro tecido livre transplantado na prática clínica, na medicina humana, ao ser utilizado em autotransplante para a correção de um grande defeito no escalpe, em conjunto com revascularização cirúrgica (McLEAN; BUNKE, 1972 apud CIUCE et al., 2003). Outros estudos em que o enxerto omental livre foi utilizado incluem revascularização em medula espinhal lesionada (ZHANG et al., 1997), na forma de enxerto livre com anastomose, para deformidades em cabeça e pescoço (LOSKEN et al., 2002) e necrose mandibular por radioterapia (MORAN; PANJE, 1987). O uso do omento livre sem anastomose vascular foi proposto para tratar feridas por queimaduras e infectadas em extremidades inferiores gravemente lesionadas, sendo considerada uma opção viável à amputação (SONG, 1989).

Os enxertos omentais livres sem anastomose podem ser aplicados apenas como camadas finas e não como amostras volumosas de tecido no local da lesão, uma vez que um enxerto espesso e gorduroso sofrerá necrose. No omento enxertado em órgão intra-abdominal lesionado, o tecido de granulação irá crescer na região, as células de gordura fundirão e serão absorvidas depois de algum tempo. Em caso de uso em tecido com serosa íntegra, não haverá a fusão dos tecidos, nem a formação de granulação no enxerto e nestes casos, infiltração de leucócitos e necrose poderão ser notados no enxerto de omento. Os autores concluíram que os enxertos omentais podem ser utilizados apenas em camadas finas e não como enxertos volumosos, uma vez que estes irão sofrer necrose a partir do quarto dia (BORNEMISZA et al., 1987).

Roa et al (1999) descreveram o primeiro relato de transplante de enxerto livre de omento em Medicina Veterinária, para extremidades em cães, por meio de técnica de microanastomose, entretanto o pequeno número de cães utilizados no experimento (sete), além de apenas dois (2/7) enxertos terem sobrevivido até o final do experimento, não permitiu que fossem obtidas conclusões estatísticas.

Ciuce e colaboradores (2003) descreveram os resultados do uso de omento livre com anastomose vascular em cirurgias variadas em humanos, como lesões cutâneas após terapia

com radiação, preservação de extremidades ou recuperação de lesão facial, com as qualidades plásticas do omento maior preservadas inteiramente na transferência de tecido livre, descrevem ainda que a morbidade abdominal causada pela laparotomia pode ser minimizada pela coleta endoscópica do tecido do omento.

Por causa das habilidades únicas do omento, ele tem sido usado como um retalho pediculado em cirurgias, como autoenxerto traqueal, autoenxerto brônquico isquêmico e isquemia em extremidades. Além disso, o retalho pediculado omental tem sido recomendado para suportar feridas esofágicas, pelas características deste órgão, historicamente associado com maior deiscência incisional do que a cirurgia em outras porções do trato alimentar, sendo a porção cervical a mais acometida por deiscência. Vários fatores podem contribuir para a alta taxa de complicações, incluindo a falta de serosa, a natureza segmentar do suprimento sanguíneo, a falta de omento, o movimento constante da deglutição e respiração e a tensão no local da cirurgia.

Em experimento realizado em cães, foi avaliada a cicatrização de lesões cirúrgicas no esôfago cervical, quanto a reepitelização, celularidade do leito da ferida, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno, com o uso de enxerto livre de omento, sem anastomose vascular. A quantidade de deposição de colágeno foi avaliada pela coloração com tricrômio de Masson e os demais parâmetros foram examinados nas seções coradas com hematoxilina e eosina. A aplicação de enxerto omental livre autólogo se mostrou uma forma confiável de diminuir as complicações pós-operatórias da operação esofágica, com base na maior celularidade, angiogênese e formação de tecido de granulação no leito da ferida no grupo experimental, em que houve a utilização de enxerto livre de omento sobre a ferida, significativamente maior do que no grupo controle (AZARI et al., 2012).

Oloumi e colaboradores (2006) realizaram estudo para avaliar o papel do omento maior livre autógeno na vasculogênese durante o processo de cicatrização óssea em 15 coelhos. Ambas as tíbias dos animais foram expostas medialmente e um orifício de 2 mm foi perfurado na diáfise proximal. Um pequeno pedaço de omento maior, obtido de uma incisão abdominal de 1 cm, foi fixado no orifício tibial esquerdo. Os animais foram eutanasiados 14 dias após a operação e os ossos removidos para estudos histopatológicos e imunohistoquímicos. Os fatores angiogênicos presentes no omento maior foram considerados como responsáveis por ter aumentado a vascularização local no defeito ósseo, mesmo sem haver conexão vascular direta com o leito receptor, demonstrando que o enxerto de omento maior livre autógeno pode influenciar a cicatrização óssea.

Saifzadeh e colaboradores (2009b) avaliaram a potencialidade do enxerto autólogo livre do omento maior não vascularizado para estimular a formação óssea em um modelo experimental de não-união hipertrófica em 12 cães, através da fixação de fragmento de 30x30 mm sobre uma fratura de 2 mm no rádio. Nos seus resultados, não houve achado de não consolidação em nenhum dos animais do grupo tratado com o enxerto omental livre, enquanto três dos cães do grupo controle foram classificados como não união óssea. Como a única variável entre os dois grupos foi a presença de omento maior usado como auto-enxerto livre no grupo tratado, os autores concluíram que a presença do omento no foco da fratura atuou por meio de seus fatores angiogênicos para induzir a angiogênese, reconstruir a circulação, aumentar o suprimento de sangue para o local da osteotomia e, conseqüentemente, acelerar o processo de cicatrização óssea, ressaltando ainda que o uso enxerto livre em vez de omento pediculado pode estar associado ao declínio na taxa de complicações, como morbidade causada por laparotomia maior, hemorragia, peritonite, obstrução intestinal e hérnias.

O retalho livre omental se mostrou anatomicamente adequado para a obtenção e cobertura de feridas, por possuir propriedades moleculares que promovem a cicatrização e melhoram a função nos locais receptores. A necessidade de entrar na cavidade abdominal, juntamente com a severidade das complicações potenciais da colheita do retalho omental, havia relegado o seu uso em grande parte, para uma segunda ou terceira escolha de enxerto ou retalho. Com o crescimento de técnicas menos invasivas, como cirurgia laparoscópica e de técnicas de microcirurgia, o retalho livre deve ser avaliado como uma opção cada vez mais valiosa para cirurgia reconstrutiva. A taxa de complicação para técnica laparoscópica e laparotomia aberta foi de 6,57% e 47,22% respectivamente (MAZZAFERRO et al., 2017).

Na revisão realizada por Mazzaferro e colaboradores (2017), o retalho livre omental demonstrou utilidade em uma ampla variedade de procedimentos reconstrutivos que abrangem a cabeça e pescoço, extremidades, vísceras e para várias finalidades, incluindo cobertura ocular, tratamento de linfedema e aumento de vascularização. Também tem sido empregado ocasionalmente na cavidade torácica e parede abdominal, com o uso concomitante de tela ou não, embora mais frequentemente como um retalho pediculado.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a viabilidade e influência do omento livre sem anastomose vascular na cicatrização cutânea, por meio de suas características anatômicas, celulares e moleculares.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Observar a evolução clínica das feridas e regiões adjacentes quanto ao aspecto, grau de coloração, edema, necrose ou infecção e permanência ou não do enxerto livre de omento;
- Observar as características histopatológicas das lesões cutâneas com e sem o uso do enxerto de omento, quanto a presença de infiltrado neutrofilico, infiltrado mononuclear, neovascularização, edema, necrose e fibrose;
- Caracterizar a deposição de fibras colágenas nas lesões que receberam o enxerto de omento em comparação aos grupos controle;
- Avaliar se o tratamento com omento é capaz de interferir na expressão de fatores de crescimento relevantes na cicatrização (VEGF, FGF e TGF- $\beta$ ).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Apreciação Bioética

O presente projeto foi submetido a avaliação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sendo aprovado em 16 de junho de 2018, protocolada sob o CEUA nº 1784040318.

### 4.2 Animais e local do Experimento

Foram utilizados 28 (vinte e oito) ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, machos, hípidos, com peso aproximado de 250 gramas e com três meses de idade, provenientes do biotério do Instituto de Biologia do Exército, localizado em Triagem, Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos no biotério durante todo o experimento, sob o mesmo manejo alimentar, com condições de temperatura controlada (ao redor de 22 °C), ciclo claro/escuro (fotoperíodo) de doze horas, gaiolas individuais após a realização das cirurgias e água e ração *ad libitum*.

### 4.3 Grupos Experimentais

O experimento consistiu na utilização de quatro grupos, de sete animais cada, sendo dois grupos controle (CT7 e CT 14) e dois tratados (OM7 e OM14), com avaliações até sete dias (grupos CT7 e OM7) e quatorze dias (grupos CT14 e OM14), para confirmação da viabilidade do uso do omento livre, sem anastomose vascular, na cicatrização de feridas cutâneas recentes.

- Grupo OM7

Neste grupo, os animais foram submetidos à excisão de fragmento circular de pele no dorso, com um centímetro de diâmetro e aplicação de enxerto de omento livre (1,0 x 1,0 cm), suturado à ferida cutânea com quatro pontos de sutura simples interrompida. Para obtenção do fragmento de omento, foi realizada celiotomia (0,5 a 1,0 cm), previamente à lesão cutânea. As avaliações macroscópicas foram realizadas nos dias 0, 3 e 7, sendo neste último dia eutanasiados e coletado material para avaliação laboratorial.

- Grupo CT7

Neste grupo, os animais foram submetidos à excisão de fragmento circular de pele no dorso, com um centímetro de diâmetro, sem a aplicação de enxerto de omento livre. Foi feita celiotomia (0,5 a 1,0 cm de extensão), de forma semelhante aos grupos tratados, com manipulação e retirada de fragmento do omento (1,0 x 1,0 cm), que foi descartado, entretanto realizadas as suturas simples interrompidas, em quatro pontos. As avaliações macroscópicas foram realizadas nos dias 0, 3 e 7, sendo neste último dia eutanasiados e coletado material para avaliação laboratorial.

- Grupo OM14

Neste grupo os animais foram submetidos à excisão de fragmento circular de pele no dorso, com um centímetro de diâmetro e aplicação de enxerto autólogo de omento livre (1,0 x 1,0 cm), suturado à ferida cutânea com quatro pontos de sutura simples interrompida. Para obtenção do fragmento de omento, foi realizada celiotomia (0,5 a 1,0 cm de extensão), previamente à lesão cutânea. As avaliações macroscópicas foram realizadas nos dias 0, 3, 7, 10 e 14, sendo neste último dia eutanasiados e coletado material para avaliação laboratorial.

- Grupo CT14

Neste grupo os animais foram submetidos à excisão de fragmento circular de pele no dorso, com um centímetro de diâmetro, sem a aplicação de enxerto de omento livre. Foi feita a celiotomia (0,5 a 1,0 cm de extensão), de forma semelhante aos grupos tratados, com manipulação e retirada de fragmento do omento (1,0 x 1,0 cm), que foi descartado, tendo sido, entretanto realizadas as suturas simples interrompidas em quatro pontos. As avaliações macroscópicas foram realizadas nos dias 0, 3, 7, 10 e 14, quando foram eutanasiados e coletado material para avaliação laboratorial.

#### 4.4 Produção da lesão cutânea, coleta e implantação do omento

A contenção foi realizada seguindo-se a forma descrita no Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP (NEVES et al., 2013), com o objetivo de reduzir o estresse e aumentar a segurança no procedimento. A anestesia foi inalatória, com os animais colocados em câmara de indução anestésica (28x14x14 cm, em plástico rígido transparente), com isoflurano a 5%

(Isoflurano 100%, BioChimico, Rio de Janeiro), com 2 L de oxigênio por um período de aproximadamente dois minutos. Em seguida, foram retirados da câmara e posicionados na mesa cirúrgica, em decúbito ventral, onde receberam durante todo o procedimento cirúrgico, o anestésico volátil em uma concentração de 3%, associado a 1,5 L de oxigênio, por meio de máscara acoplada a circuito anestésico sem re-inalação de gases.

No transcirúrgico, todos os animais foram medicados com analgésico opióide, Cloridrato de Tramadol (Tramal Inj, Grünenthal, São Paulo), na dose de 6,0 mg/kg, via subcutânea (SC), em dose única

Para a obtenção do omento foi utilizado o decúbito dorsal, com tricotomia, preparo cirúrgico da região ventral, antissepsia local com clorexidina degermante (Riohex 2% Degermante, Rioquímica, Duque de Caxias), e álcool 70% (Rialcool 70, Rioquímica, Duque de Caxias) e o acesso ao omento em todos os grupos foi realizado por celiotomia mediana, sendo removido fragmento de aproximadamente 1,0x1,0 cm da porção mais distal da bursa omental, para posterior utilização na ferida dorsal dos grupos tratados. Em todos os grupos foi realizada a cirurgia de coleta do fragmento do omento, incluindo os grupos controles, de forma a manter o mesmo tempo de cirurgia, aproximadamente, em todos os animais e as mesmas dificuldades no pós-operatório, incluindo a cicatrização da ferida abdominal. O fragmento de omento foi mantido em luvas estéreis de latex, embebidas em solução estéril de cloreto de sódio 0,9%, a fim de manter o tecido sem sofrer dessecação e facilitar a manipulação (LASCELLES; WHITE, 2001).

Durante o manuseio do omento, grande cuidado foi tomado para evitar a manipulação excessiva e, após mobilização do animal para o decúbito ventral, o retalho foi fixado à ferida dorsal criada nos animais dos grupos tratados (OM7 E OM14) utilizando-se suturas simples interrompidas de poliglactina 910 5.0, em quatro pontos. Nos grupos controle (CT7 e CT14) os quatro pontos foram aplicados, apesar de não ter sido implantado o enxerto omental.

Os animais foram então posicionados em decúbito ventral, efetuada a tricotomia na região imediatamente caudal às escápulas, assepsia local e com a utilização de punch metálico de biópsia (Punch para biópsia dermatológica aço inox, Ortovet, São Paulo), com diâmetro de 1,0 cm (figura 11). Foi demarcado segmento circular de pele na região dorsal torácica, completando-se a excisão com o auxílio de tesoura e pinça, criando-se ferida cutânea de espessura total, sem realização de sutura, ou seja, com cicatrização por segunda intenção.



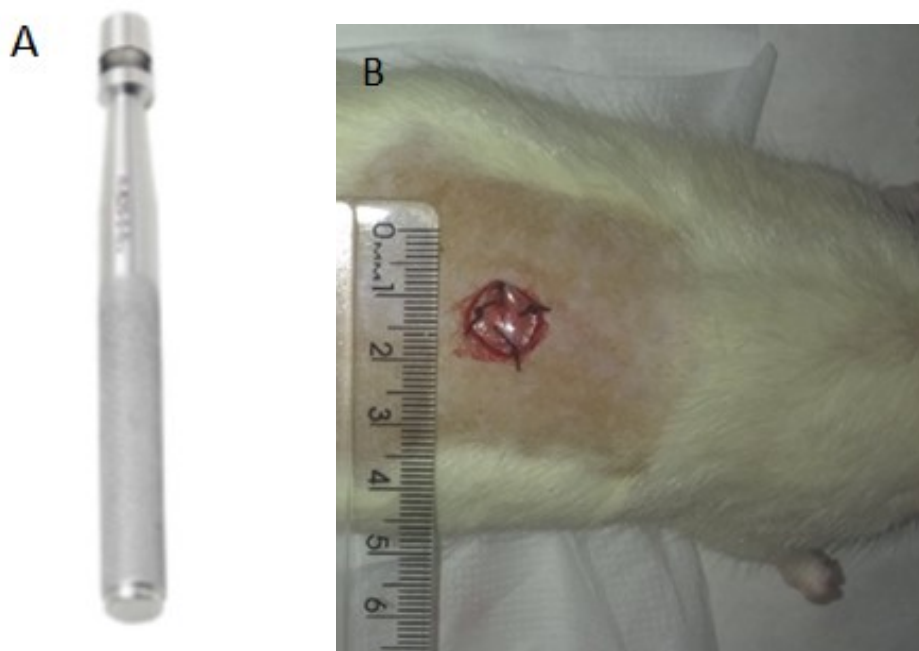


Figura 11. Uso de enxerto omental livre sem anastomose vascular na cicatrização cutânea de ratos. A - Punch metálico de biópsia. B – Imagem de rato em decúbito ventral com lesão cutânea recém-produzida por “punch” (dia 0) e aplicação de suturas de poliglactina 910 5.0.

A poliglactina 910 é um fio cirúrgico multifilamentar absorvível, confeccionado a partir de polímeros inertes, não-antigênicos, não piogênicos e que provocam uma reação inflamatória tecidual leve, sendo reabsorvido em 60 a 80 dias, com boa resistência à tração e de fácil manuseio, além de não promover a formação de aderências locais (SAITO et al, 2006). Por ser largamente utilizado em medicina veterinária e por suas características descritas acima, foi a escolha para a ancoragem dos enxertos.

#### 4.5. Eutanásia

Os procedimentos de eutanásia foram realizados nos dias 7 (OM7 e CT7) e 14 (OM14 e CT14), por meio de indução em câmara anestésica (28x14x14 cm, em plástico rígido transparente), com isoflurano a 5% (Isoflurano 100%, BioChimico, Rio de Janeiro), com 2 L de oxigênio por um período de aproximadamente dois minutos, seguido de injeção intraperitoneal de Tiopental (Thiopentax 1g, Cristália, Itapira), 100 mg/kg, Intraperitoneal + lidocaína 10mg/ml (Cloridrato de Lidocaína 2%, sem vasoconstrictor, Novafarma, Anápolis).

#### 4.6. Avaliações

#### 4.6.1 Análises “ante-mortem”

As feridas foram avaliadas em todos os animais no dia de sua realização (d0), nos dias pós-operatórios 03 e 07 em todos os grupos e também nos dias 10 e 14 nos grupos CT14 e OM14 (figura 12).

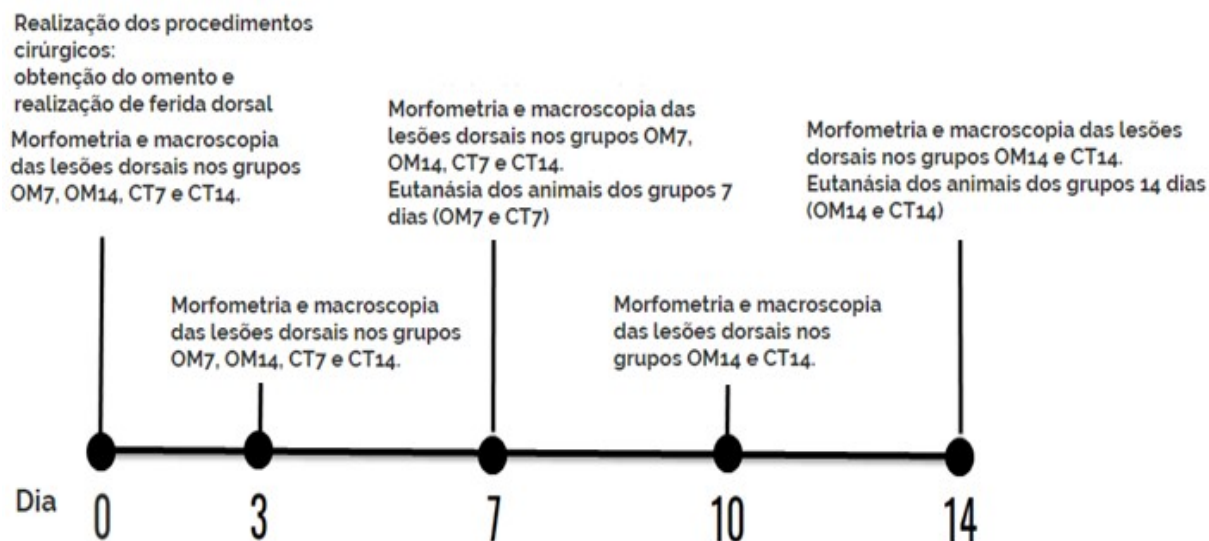


Figura 12. Esquema ilustrativo do protocolo de análise de feridas em ratos com uso de enxerto omental livre e controles. As avaliações morfométricas e macroscópicas foram realizadas nos dias 0, 3, 7, 10 e 14 do experimento.

##### 4.6.1.1 Análise macroscópica

Na avaliação macroscópica das feridas e regiões adjacentes foram considerados o aspecto, grau de inflamação e coloração, edema, necrose ou infecção e permanência ou não do omento, nos grupos em que foi utilizado.

##### 4.6.1.2 Análise morfométrica

Foi realizado acompanhamento fotográfico de acordo com o descrito por Amadeu e colaboradores (2007), utilizando-se câmera digital modelo SONY Cyber-shot DSC-W110, 7.2 megapixels, mantida em tripé à distância constante de 20 cm da base com eixo da lente objetiva perpendicular à superfície. Ainda, uma régua milimetrada foi alocada caudalmente à ferida para permitir a calibração da mensuração linear.

As imagens digitalizadas foram analisadas em computador com auxílio do programa IMAGE J (figura 13), sendo as áreas medidas em d0 consideradas 100% para fins de comparação com os dias subsequentes, que foram calculados como porcentagens relativas da área inicial da lesão. Para realização das fotografias nos dias subsequentes (d3/d7/d10/d14)

aos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com isoflurano a 5%, em câmara de indução anestésica para imobilização dos mesmos.

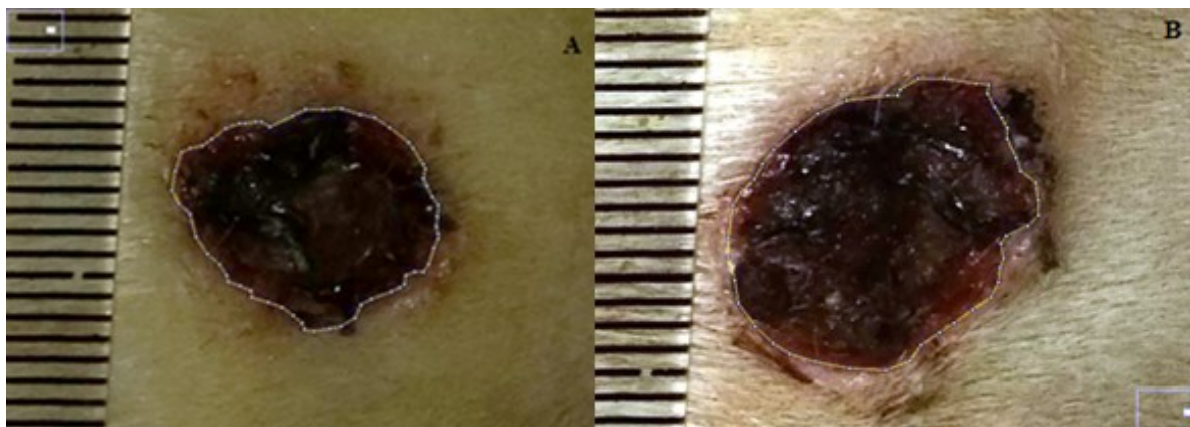


Figura 13. Demarcação da área de feridas (linha branca pontilhada) em dorso de rato a partir de imagem digitalizada para mensuração pelo programa ImageJ.

#### 4.6.2 Análises “post-mortem”

Após eutanásia dos animais, foi coletado fragmento de pele contendo a lesão e uma área de pele íntegra ao redor, com aproximadamente 2,0 x 2,0 cm, sendo logo em seguida divididas em duas, por meio de incisão com auxílio de bisturi (figura 14).

As porções craniais das peças foram mantidas embebidas em formalina 10% tamponada em superfície lisa não absorvente por 10 minutos com posterior acondicionamento em frasco plástico contendo também formalina 10% tamponada no volume equivalente a aproximadamente 15 vezes o volume do fragmento, para posteriores análises histológicas. Foram feitos blocos de parafina e cortes de 5  $\mu$ m para a montagem de lâminas, sendo duas lâminas (Lâmina comum lapidada para microscopia, SPLAB, São Paulo) para avaliação histopatológica e seis lâminas polarizadas silanizadas lapidadas (Starfrost Advanced Polycat, Knitell Glass, Germany) por animal para imunohistoquímica.

As porções caudais das peças foram depositadas em microtubos e embebidas em Trizol (Ambion Co, USA), com imediata preservação em freezer – 80° C até a realização das análises de expressão gênica em reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR).

As análises histopatológicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto de Veterinária da UFRRJ e a imunohistoquímica no Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose da FIOCRUZ. As análises moleculares foram executadas no Laboratório de

Biologia Molecular da Divisão de Ensino e Pesquisa e do Biotério da Divisão de Veterinária do Instituto de Biologia do Exército (IBEx).

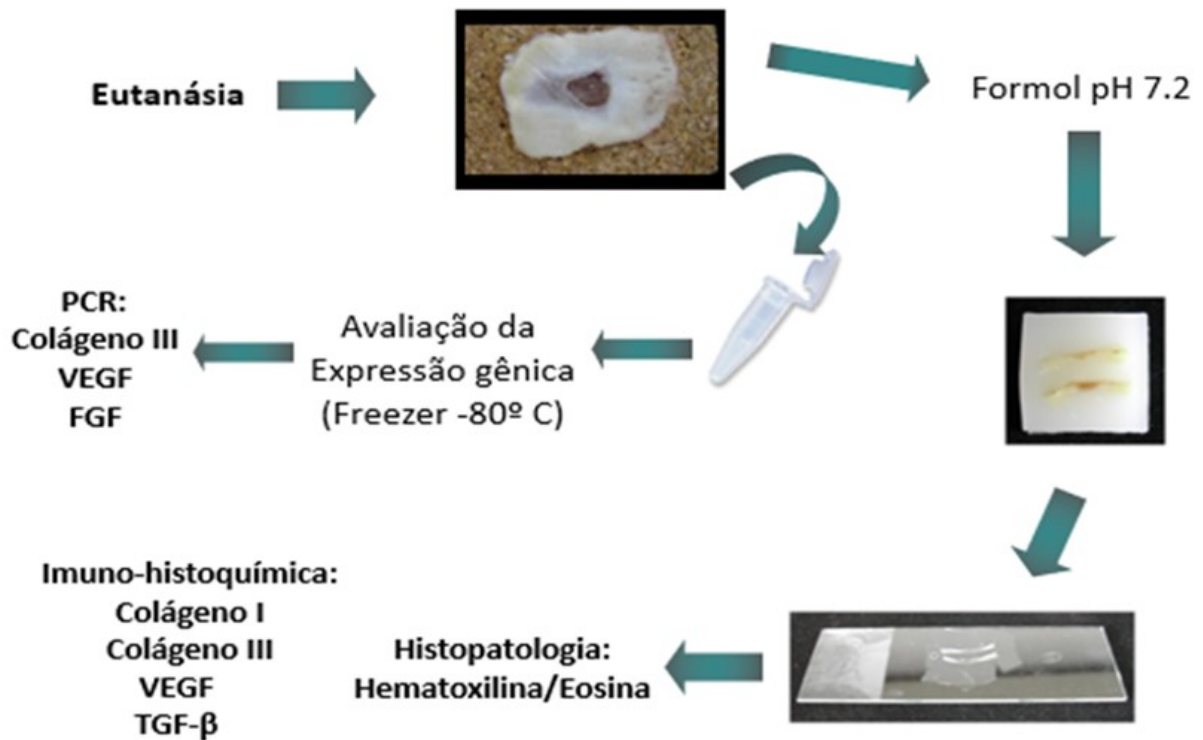


Figura 14. Esquema ilustrativo do protocolo de Análises “post-mortem” de fragmento de pele contendo a lesão em ratos com uso de enxerto omental livre e controles. As avaliações laboratoriais foram realizadas nos dias 7 e 14 do experimento (Adaptado de GEORGII, 2011).

#### 4.6.2.1 Avaliação histopatológica

Coradas por hematoxilina-eosina (HE) para análise microscópica, as lâminas foram avaliadas através de sua conformação histológica, quanto à presença de infiltrado neutrofílico e mononuclear, presença de neovascularização, edema, necrose e fibrose. Os dados foram classificados utilizando-se uma tabela objetiva de escores, de forma similar à análise qualitativa utilizada por Batista e colaboradores (2008), graduados como: 0 - ausente, 1 - discreto, 2 - leve, 3 - moderado e 4 - intenso.

#### 4.6.2.2 Imunohistoquímica

A imunohistoquímica (IH) foi realizada nas lâminas confeccionadas com o material coletado aos 14 dias nos grupos Omento e Controle (OM14 e CT14), com a utilização de anticorpos monoclonais e policlonais (tabela 2), como descrito anteriormente por Souza et al (2005), para quantificação de TGF- $\beta$ , VEGF, colágeno tipo I e colágeno tipo III nas lesões cutâneas coletadas. O preparo da técnica de IH nas lâminas com o material obtido aos sete

dias pós-lesão não possível, por não ter ocorrido a fixação do tecido adiposo do omento no momento do tratamento com xilol/álcool, diferente dos materiais coletados aos 14 dias, quando já havia considerável fibrose da ferida. Por este motivo não houve a análise imunohistopatológica das peças coletadas aos sete dias.

Tabela 2. Relação de anticorpos utilizados em imunohistoquímica de lesões cutâneas em ratos com o uso de enxerto omental livre sem anastomose vascular.

<b>Proteína</b>	<b>Código</b>	<b>Animal de origem</b>	<b>Diluição</b>	<b>Tipo</b>
TGF- $\beta$	ABCAM ab92486	Coelho	1:25	Policlonal
VEGF	ABCAM ab52917	Coelho	1:100	Monoclonal
Colágeno I	ABCAM ab34710	Coelho	1:100	Policlonal
Colágeno III	ABCAM ab7778	Coelho	1:100	Policlonal

Descrito de forma breve, o protocolo de IH incluiu preparo de cortes das áreas de lesões, fixados em lâminas silanizadas, para posterior desparafinização por meio de aquecimento em estufa a 60° C, por 10 min, em xilol, seguido de banhos seriados em xilol e álcool em diferentes concentrações, a temperatura ambiente e em sequência, foi realizada a inibição da peroxidase endógena, pelo uso de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em água destilada, 10 min a temperatura ambiente). Os cortes foram então submetidos a duas lavagens em PBS durante 5 min cada. Para recuperação antigênica, foi utilizado tampão citrato pH 6,0 (banho maria a 95° C, por 30 min, seguido de resfriamento por 20 min a temperatura ambiente). A inibição das ligações inespecíficas foi feita com o uso de albumina de soro bovino (Sigma, St. Louis, EUA) 0,4% em tampão fosfato-salino (PBS), por 20 min a temperatura ambiente, seguido do anticorpo primário específico para detecção das citocinas e células (60 min a temperatura ambiente), dentro da diluição recomendada pelo fabricante e descrita na tabela 02. Ao término da incubação, foram realizadas duas lavagens com PBS, cinco minutos cada, seguidas da utilização do polímero-HRP (LifeTechnologies, USA) por 15 minutos, com nova lavagem em PBS (2x5 minutos). O revelador utilizado foi cromógeno 3-amino-9-etilcarbazol (AEC substrate kit, Invitrogen, USA). Após a visualização da marcação em microscópio óptico, a reação foi interrompida com água tipo II, sem utilização de contra-coloração. A montagem das lâminas foi feita em meio aquoso (Faramount Aqueous Mounting Medium, Dako, CA, USA). Controles negativos foram realizados trocando o anticorpo primário por PBS e não foi observada marcação. A mensuração das marcações positivas para

VEGF, TGF- $\beta$ , colágenos I e III foi realizada através do programa ImageJ. A leitura das lâminas foi realizada em microscopia ótica de luz invertida e registros foram realizados com câmera fotográfica.

#### 4.6.2.3 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Com o uso da técnica de reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR), através do mRNA expresso, responsável pela síntese proteica dos alvos escolhidos, foram quantificados VEGF, FGF e colágeno tipo III. Os primers utilizados para cada produto foram descritos na tabela 3 abaixo:

Tabela 3. Relação de primers utilizados em RT-PCR para avaliação da expressão gênica em lesões cutâneas em ratos com ou sem o uso de enxerto omental livre sem anastomose vascular.

<b>Gene Alvo</b>	<b>Primer Utilizado</b>	<b>Tamanho *</b>
FGF2	FGF2F 5'-CACACGTCAAACCTACAGCTCCAAG-3' FGF2R 5'-TTCGTTTCAGTGCCACATACCA-3'	216
VEGF	VEGFF 5'-CACTGGACCCTGGCTTTACTG-3' VEGFR 5'-CACTCCAGGGCTTCATCATTG-3'	254
Colágeno Tipo III	CO3F 5'-TGATGGGATCCAATGAGGGAG-3' CO3R 5'-GAGTCTCATGGCCTTGCGTGTTT-3'	143
$\beta$ -actina	ActF 5'-GTGGGCCCGCCCTAGGCACCA-3' ActR 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAG-3'	245

\* - Tamanho expresso em pares de bases (pb)

A extração de RNA total foi iniciada com a maceração do fragmento da ferida, embebido em Trizol (Ambion Co, USA). Os microtubos foram posteriormente centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C em centrífuga de bancada e a fase superior foi transferida para um novo microtubo, ao qual adicionou-se igual volume de clorofórmio seguido de centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm, a 4°C. A fase superior foi transferida para um novo microtubo e o RNA foi precipitado pela adição de dois volumes de etanol absoluto gelado e 1/10 do volume de NaOAc 3M pH 5,2; 1mM EDTA. Após a incubação por 20 minutos a -80°C, centrifugou-se por 25 minutos a 14.000 rpm, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet

lavado em 1mL de etanol 80% seguido de centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm a 4° C. O etanol foi removido e o pellet suspenso em 30 µL de água livre de nucleases. A concentração de RNA foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific).

Uma alíquota de 4 uL da suspensão de RNA foi utilizada para avaliar a qualidade da extração por eletroforese (5V/cm) em gel de agarose 1% contendo 20% de formaldeído 37%, 10% de tampão MOPS 10X (MOPS 0,2M; acetato de sódio 50 mM; EDTA 10 mM; pH 7,2) e 0,5X de Sybr safe (Invitrogen).

O RNA foi utilizado em uma reação de transcrição reversa usando o kit Superscript II RNase Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) para a obtenção do cDNA a partir de 1,0 µg de RNA, sendo aquele armazenado a -20 °C e posteriormente utilizado nas reações de amplificação em StepOnePlus System (ThermoFisher Scientific, USA). Os valores relativos da expressão gênica foram determinados pelo método comparativo 2- $\Delta\Delta$ Ct e os resultados representam a razão de expressão de mRNA no 7º dia (fase de proliferação) e 14º dia de intervenção (fase de remodelação).

A figura 15 resume as etapas de avaliações antes e após a eutanásia dos animais (*ante-mortem e post-mortem*).

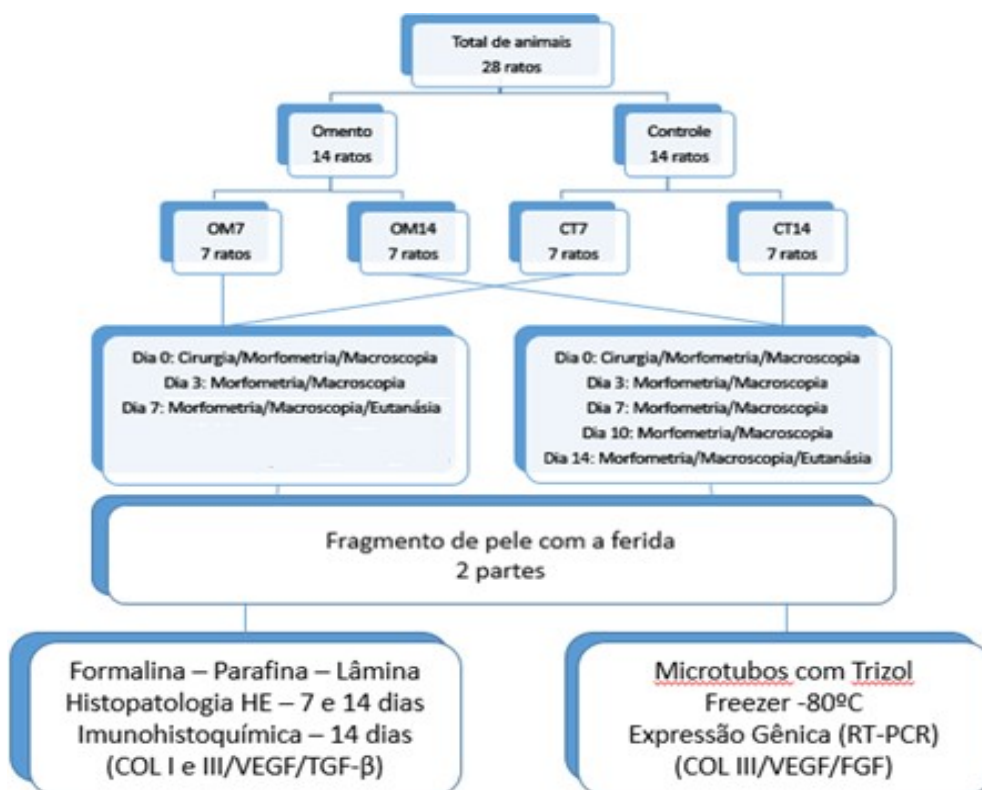


Figura 15. Fluxograma ilustrativo do protocolo de avaliações de lesões cutâneas agudas em ratos com e sem o uso de enxerto omental livre sem anastomose vascular.

#### 4.6.3 Análise estatística

Todos os cálculos foram realizados por meio do programa GraphPad Instatprism 6.01 (GraphPad Software Inc; San Diego, EUA). A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk e para os dados com distribuição normal (paramétricos) foi utilizada Análise de Variância Univariada (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey, para comparações múltiplas ou teste T não pareado, com correção de Welch's. Para os dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Todos os valores estão expressos como médias  $\pm$  desvio padrão e em todos os casos,  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção e manipulação do omento não apresentaram dificuldades em nosso experimento, no qual a celiotomia possibilitou a coleta sem complicação decorrente deste procedimento em qualquer dos animais dos grupos tratados e controles. O omento forneceu tecido suficiente para recobrir as lesões cutâneas, com excelente plasticidade para ser moldado e manipulado, quando mantido hidratado, corroborando o que foi descrito por Mazzaferro e colaboradores (2017) e Lascelles; White (2001), que descreveram o omento como excelente órgão doador, por possuir grande volume e ser de fácil obtenção.

A utilização em nosso experimento de enxerto livre de omento não apresentou algumas desvantagens relatadas na literatura quando comparado ao retalho pediculado (MAZZAFERRO et al., 2017; SAIFZADEH; HOBENAGHI; ASADOLAH, 2009) e sua transposição, como formação de seroma, fístulas, herniação pelo local de passagem do pedículo vascular na parede abdominal, hemorragia ou necrose intra-abdominal pela torção do omento, além de danos pela tunelização.

### 5.1 Avaliações Macroscópicas e Morfométricas

Nos grupos tratados OM7 e OM14, a aparência macroscópica e os resultados funcionais foram favoráveis em 12 dos 14 animais, tendo ocorrido formação de abscessos no subcutâneo em dois. Deve-se considerar que nos grupos controle (CT7 e CT14), também dois animais tiveram formação de secreção purulenta.

A capacidade do enxerto omental livre sem anastomose de controlar infecção, descrita por Song (1989) ao tratar pacientes com infecções em extremidades, por Chandra e colaboradores (2011), que avaliaram o papel do omento na defesa através da expressão de citocinas e peptídeos antimicrobianos e de Shah e colaboradores (2012), que demonstraram haver células com capacidades imunomoduladoras e células mesenquimais indiferenciadas no omento, que promoveriam regeneração tecidual, não foi ressaltada em nosso trabalho. Embora fosse esperado que o omento controlasse processos infecciosos no foco da ferida, deve-se considerar que os animais foram mantidos em caixas com cama de maravalha, trocadas duas vezes por semana (podendo ser considerado um ambiente com contaminação) e que não

houve uso de qualquer medicamento antisséptico ou antibiótico nos animais, seja tópico ou sistêmico, nos grupos controles e tratados.

Macroscopicamente houve hemorragia no local da cirurgia e nas imagens realizadas no pós-operatório imediato em vários animais dos grupos tratados (10/14), não sendo verificada a particularidade atribuída ao omento de promover ativação da protrombina e de rápida mudança do fibrinogênio para a fibrina encontrada quando em presença de tecido omental, o que provocaria hemostasia em curto espaço de tempo, conforme descrito por Liebermann-Meffert; White (2012) como uma função útil em ferimentos hepáticos e esplênicos.

Outro parâmetro importante a ser considerado nos resultados macroscópicos é a capacidade do enxerto de omento se aderir ao ferimento. Como descrito por Azari e colaboradores (2012), que utilizaram o enxerto omental em feridas esofágicas, órgão de grande motilidade e dificuldade de cicatrização, em nosso experimento não houve perda do enxerto em nenhum dos animais dos grupos tratados, mesmo considerando-se a fragilidade do tecido implantado. De forma similar aos autores citados, os enxertos foram fixados por meio de alguns poucos pontos e em nosso caso, logo no dia 3, ficou evidente que o tecido do omento estava fixo e aderido ao ferimento criado em toda a extensão, não sendo possível distingui-lo da crosta existente. Este era um objetivo específico do projeto, avaliar a viabilidade e permanência do enxerto no local da ferida.

Não houve qualquer problema de rejeição ao tecido do enxerto no local da ferida nos grupos tratados, estando o enxerto de omento autólogo livre (não pediculado) totalmente incorporado à ferida, em todos os momentos de avaliação clínica, de forma similar ao descrito por Saifzadeh e colaboradores (2009b), que utilizaram enxerto omental autólogo sem anastomose vascular na reconstrução de vascularização de fraturas recentes em um modelo de não união em cães, sendo citado como vantagem o uso de material biológico autólogo. Nossos dados encontram-se em consonância com o relatado por Trivedi e Gupta (2013), que aplicaram o omento autólogo e homólogo em cães mestiços e obtiveram resultados esperados na revascularização de feridas em membros do primeiro grupo (mas não quando utilizado o enxerto homólogo de omento, no qual houve necrose e perda do enxerto em 7/10 animais).

Em nosso experimento, como esperado, por se tratar de ferimentos tratados por 2ª intenção, houve a formação de cicatriz tanto nos grupos tratados como nos controles. A possibilidade de regeneração pela presença de células omentais, similares a células tronco, descrita por Meza-Perez; Randall (2016); Litbarg e colaboradores (2007) não modificou o

aspecto final das lesões aos 14 dias. Conforme demonstrado por Dunkin e colaboradores (2007), a profundidade do ferimento é determinante para a evolução do reparo por segunda intenção, sendo que lesões com espessura total da pele são caracterizadas por formação de fibrose com conseqüente cicatriz e não regeneração; Em nosso experimento, não houve modificação deste processo, mesmo em presença de células com capacidade de regeneração, oriundas do omento.

As mensurações de área das feridas foram realizadas nos dias 0, 3, 7, 10 e 14 do experimento e comparadas com os grupos controles. As imagens para acompanhamento fotográfico estão dispostas na figura 16. Foi observado aumento no tamanho da ferida na mensuração ao terceiro dia, o que é comum em feridas abertas devido à retração das margens; a partir de então as feridas diminuíram significativamente de tamanho em todos os grupos quando comparava-se com as medidas do dia 3, com o grupo controle mostrando maior nível de significância ao sétimo dia (figuras 17 e 18). Entretanto, nos testes de comparação entre os grupos os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os tratados e controles, não sendo possível afirmar que o omento promoveu a diminuição da área da ferida no modelo utilizado.

Estes dados devem ser analisados cuidadosamente, devendo-se considerar o fato de que as mensurações das feridas com o omento foram dificultadas pela sobreposição das margens da ferida pelo tecido omental, além de, possivelmente, ter havido aumento de tamanho deste pela ativação após sua implantação na ferida, devido ao processo inflamatório e presença do fio de sutura, conforme descrito por Litbarg e colaboradores (2007), que observaram um aumento de até 20 vezes no tecido do omento ativado por corpo estranho (polidextrano) em um prazo de uma semana. Dados similares foram descritos por Teixeira (2018), que verificou aumento do enxerto de omento livre sem anastomose quando utilizado no espaço subcutâneo sob feridas suturadas de pele de felinos submetidos a ovariossalpingohisterectomia. Diferentemente destes achados, Claro Júnior e colaboradores (2014) ao utilizarem o omento maior em retalho pediculado no subcutâneo de ratas obesas, relataram haver contração do retalho ao invés de aumento do tamanho quando ativado, em comparação ao retalho mantido dentro da cavidade peritoneal.

Deve ser ressaltado que a re-epitelização é um parâmetro importante na cicatrização, com conseqüente fechamento do meio interno o mais precoce possível. Em nosso experimento não foi possível mensurar a re-epitelização e não houve fechamento completo das feridas aos 14 dias em nenhum dos animais dos grupos tratados e dos controles. A

avaliação da área de re-epitelização, como descrito por Amadeu e colaboradores (2007) e Georgii (2011), foi inviável nas feridas tratadas com o enxerto omental, por haver a sobreposição do tecido do enxerto sobre as bordas da língua migratória de queratinócitos.

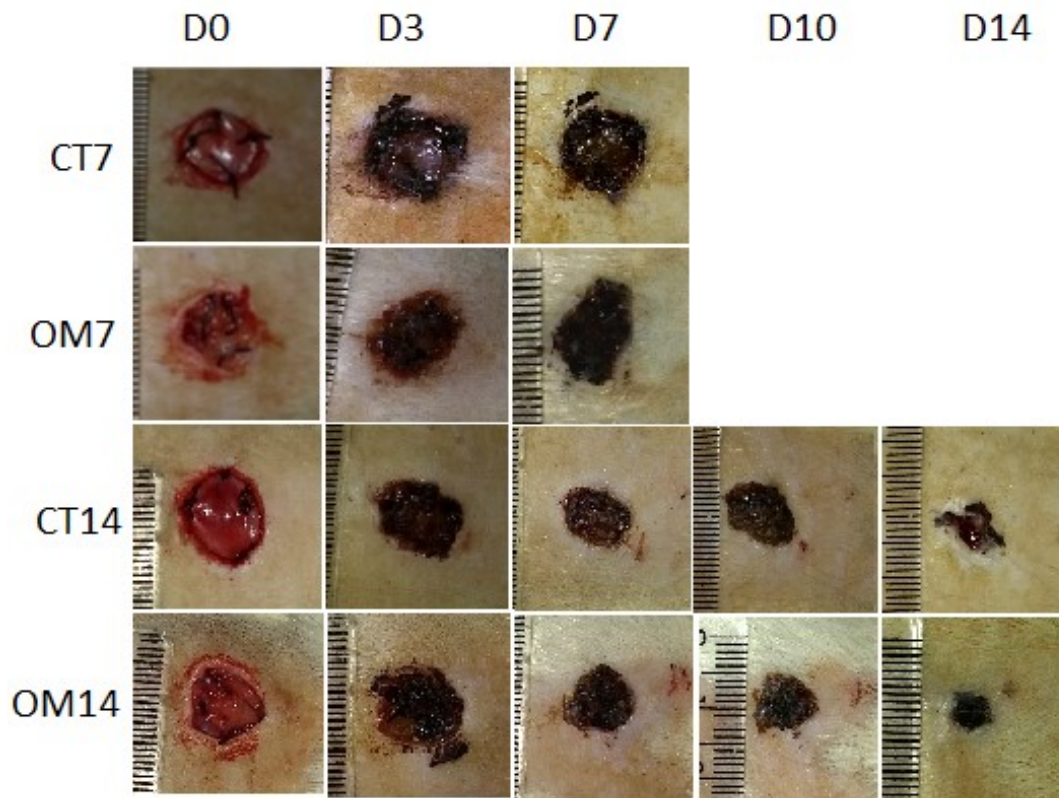


Figura 16. Evolução das lesões cutâneas de ratos avaliadas nos dias 0, 3, 7, 10 e 14 para posterior análise morfométrica com o software Image J. Grupos: CT7 - Controle 07 dias, OM7 - Omento 07 dias, CT14 - Controle 14 dias, OM14 - Omento 14 dias.

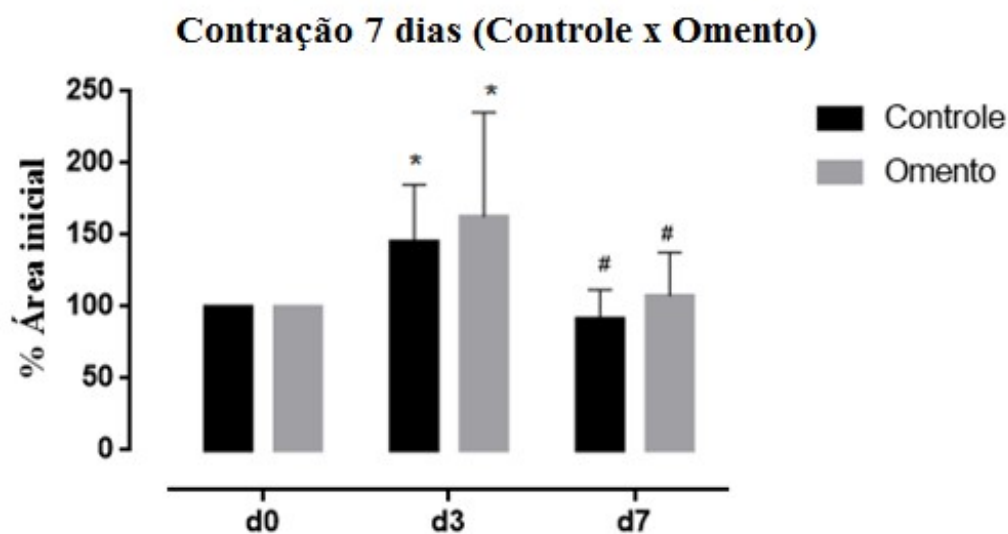


Figura 17. Análise morfométrica das lesões cutâneas de ratos com ou sem o uso de enxerto omental livre sem anastomose vascular, aos sete dias pós-cirurgia. As áreas foram calculadas a partir das

imagens obtidas nos dias 0, 3, 7 e analisadas com o software Image J. Os dados são expressos como média  $\pm$  DP. \* diferença significativa em relação ao momento d0 (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ); # diferença significativa entre os momentos d3 e d7 (# $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ); não houve diferenças significativas entre os grupos Controle e Omento em nenhum dos momentos ( $p > 0,05$ ).

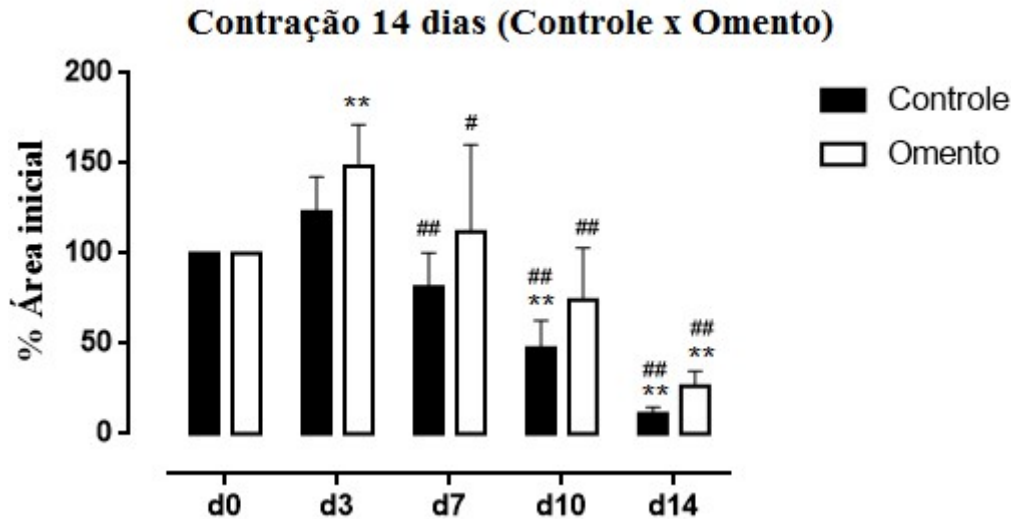


Figura 18. Análise morfométrica das lesões cutâneas de ratos com ou sem o uso de enxerto omental livre sem anastomose vascular, aos quatorze dias pós-cirurgia. As áreas foram calculadas a partir das imagens obtidas nos dias 0, 3, 7, 10 e 14 e analisadas com o software Image J. Os dados são expressos como média  $\pm$  DP \* diferença significativa em relação ao momento d0 (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ); # diferença significativa em relação ao momento d3 (# $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ); não houve diferenças significativas entre os grupos Controle e Omento em nenhum dos momentos ( $p > 0,05$ ).

## 5.2 Avaliações histopatológicas

Os estudos histopatológicos são normalmente utilizados para avaliar a eficácia de produtos na cicatrização de feridas, e neste trabalho, foi utilizada coloração com hematoxilina e eosina (HE). As peças histológicas, coletadas cirurgicamente após eutanásia dos animais, foram avaliadas quanto à presença de infiltrado neutrofílico, infiltrado mononuclear, neovascularização, edema, necrose e fibrose, nos grupos tratados (OM7/OM14) e nos grupos controle (CT7/CT14), graduadas de acordo com sistema de escores, em 0 - ausente, 1 - discreto, 2 - leve, 3 - moderada e 4 - intenso, estando a frequência dos achados discriminada na tabela abaixo:

Tabela 4. Frequência de observações na avaliação microscópica de cicatrização cutânea em ratos tratados com enxerto omental livre, sem anastomose vascular, em comparação com grupos controle.

Escore	Grupo	Infiltrado		Neovascularização	Edema	Necrose	Fibrose
		Neutrofílico	Mononuclear				
0–Ausente		0	4	2	6	0	0
1–Discreto		4	0	2	1	0	0
2–Leve	OM7	1	2	3	0	1	1
3–Moderado		0	1	0	0	3	4
4 – Intenso		2	0	0	0	3	2
0–Ausente		0	2	2	7	0	0
1–Discreto		1	1	5	0	1	0
2–Leve	CT7	0	2	0	0	0	1
3–Moderado		4	1	0	0	3	4
4–Intenso		2	1	0	0	3	2
0–Ausente		3	1	4	3	0	0
1–Discreto		0	1	0	0	1	1
2–Leve	OM14	1	0	2	3	3	3
3–Moderado		3	5	1	1	3	3
4–Intenso		0	0	0	0	0	0
0–Ausente		5	3	5	6	5	0
1–Discreto		0	2	1	1	0	1
2–Leve	CT14	2	2	1	0	2	5
3–Moderado		0	0	0	0	0	1
4–Intenso		0	0	0	0	0	0

OM7 – Grupo omento sete dias; CT7 - Grupo controle sete dias; OM14 – Grupo omento quatorze dias; CT14 - Grupo controle quatorze dias.

Na histopatologia todos os enxertos omentais livres mostraram-se viáveis, sendo que houve incorporação do tecido à ferida, com formação de tecido fibroso entremado ao enxerto. Considerando-se a infiltração inflamatória, não houve diferença entre os grupos tratados e controles quanto a neutrófilos, tanto nos grupos 7 dias quanto nos 14 dias (figura 19). Houve diferença significativa na avaliação do infiltrado mononuclear (OM  $2,286 \pm 1,254$  vs CT  $0,857 \pm 0,899$ ,  $p = 0,0437$ ) nos animais eutanasiados aos 14 dias, quando vários animais tratados (5/7) com omento receberam escore moderado, enquanto o escore mais elevado no grupo controle foi leve (2/7), achado similar ao de Azari e colaboradores (2012) que avaliaram o enxerto omental livre autólogo e sem anastomose vascular na cicatrização de

esôfago de cães. Este dado pode ser considerado esperado, pelo aumento considerável que o omento tem ao ser exposto a fatores pró-inflamatórios, quase que totalmente devido ao seu estroma, rico em macrófagos.

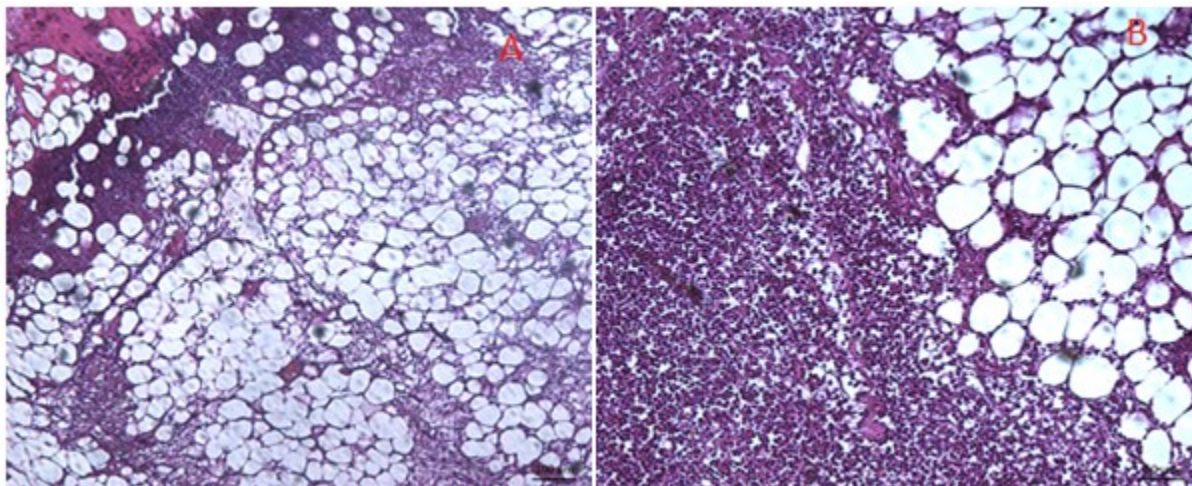


Figura 19. Avaliação histopatológica de lesão cutânea tratada com enxerto omental livre sem anastomose vascular aos sete dias de evolução da ferida (OM7) em rato, destacando-se o infiltrado inflamatório. (A) infiltrado neutrofilico moderado, coloração HE, objetiva 10x. (B) infiltrado mononuclear intenso, coloração HE, objetiva 20x.

Considerando-se a neovascularização, importante parâmetro quando se busca as vantagens de utilizar o enxerto de omento, não houve diferença significativa entre os grupos tratados e controles (tabela 5), diferente dos achados de Saifzadeh, Hobbenaghi, Asadolahi (2009), que utilizaram enxerto omental livre autólogo na cicatrização de lesões esofágicas, com aumento da neovascularização nos grupos tratados e por Azari e colaboradores (2012), que descreveram haver angiogênese significativa ( $p=0,027$ ) no grupo tratado com enxerto omental livre em esôfago de cães.

Em nosso trabalho, não ficou claro o aumento de vasos sanguíneos no local da ferida, havendo três animais com neovascularização leve (grau 2 no escore estabelecido) no grupo OM7 e dois animais com neovascularização leve e um animal classificado como moderado (grau 3) no grupo OM14 (figura 20). Como descrito por Litbarg e colaboradores (2007), a capacidade de promover cicatrização através do omento está intimamente associada ao grande número de vasos neoformados, entre outros fatores envolvidos, que surgem quando o omento é ativado. Na sua forma não ativada, o omento tem predominância de tecido adiposo, mas uma vez estimulado por corpo estranho ou inflamação, o número de vasos aumentou em três vezes e a quantidade de sangue em duas vezes no período de uma semana.

A formação de edema (figura 20B) foi um achado pouco frequente e com baixa intensidade, sem diferença estatística entre os grupos tratados com enxerto omental livre sem anastomose e os controles. Apesar da literatura ressaltar a capacidade do omento na drenagem de líquidos, deve-se considerar que os artigos referem-se ao uso do enxerto pediculado, como no trabalho de Goldsmith e colaboradores (1967), que relatam haver absorção de edema na presença de tecido omental utilizado para tratar linfedema em membros superiores de pacientes humanos mastectomizados, e de Goldsmith; Steward; Duckett (1985), que descreveram a capacidade do omento pediculado aumentar a vascularização e diminuir a formação de edema em gatos com lesão medular. Mais recentemente, Meza-Perez; Randall (2017) descreveram as capacidades imunológicas do omento, mas também enfatizaram a intensa vascularização e estímulo à angiogênese, o que levaria a um crescimento de vasos sanguíneos, que aliados ao seu potente sistema linfático, poderia absorver enormes quantidades de fluido e resíduos metabólicos e tóxicos do local de inflamação e cicatrização. Uma vez que no presente trabalho o enxerto não tinha um pedículo que permitisse a drenagem, e também não foi observado aumento na vascularização, era de se esperar que não houvesse uma maior atuação do biomaterial na drenagem de líquidos, em relação ao controle.

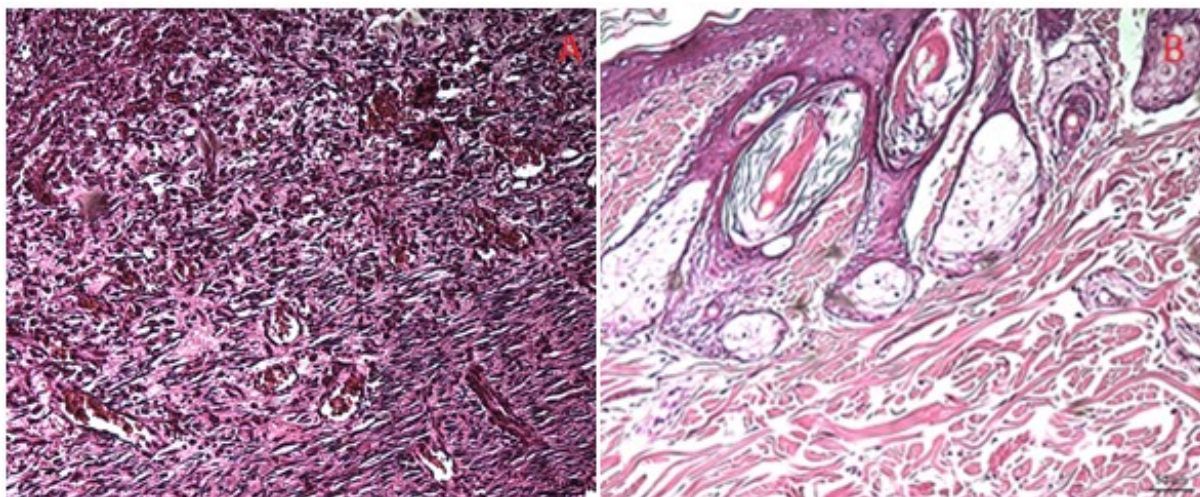


Figura 20. Avaliação histopatológica de lesão cutânea em rato tratado com enxerto omental livre, sem anastomose vascular, quanto a neovascularização (OM14) e edema (OM7). (A) formação difusa de vasos com presença de hemácias em seu interior, característico de neovascularização em omento, coloração HE, objetiva 20x. (B) fibras de colágeno levemente espaçadas em derme profunda, característico de edema, coloração HE, objetiva 20x.

Considerando-se a presença de necrose e de fibrose, dois parâmetros relevantes na resolução de feridas, é possível verificar que houve necrose moderada (3/7) ou leve (3/7) do tecido adiposo em animais do grupo tratado OM14 (figura 21A), principalmente na parte



central do enxerto, de padrão concêntrico, de forma bastante similar ao descrito por Bornemisza e colaboradores (1987), ao utilizarem enxerto omental sem anastomose na cicatrização de serosa gástrica, em oposição a apenas 2/7 dos animais CT14, que apresentaram necrose leve e 5/7 com ausência deste parâmetro. Estes autores descreveram que o uso do omento livre em fragmentos volumosos poderia levar à necrose a partir do quarto dia. Em nosso trabalho, o fragmento retirado da bursa omental, acabou por incluir o folheto ventral e também o dorsal da bursa, levando a que o enxerto na ferida tivesse excesso de tecido em muitos animais, o que pode ter gerado isquemia, seguida de necrose.

Não houve diferença estatisticamente significativa neste parâmetro histopatológico, entretanto deve ser considerado o uso de fragmentos do enxerto de omento em tamanho similar à lesão a ser recoberta, a fim de evitar esta possibilidade. Necrose no tecido adiposo do omento também foi descrita por Shen; Shen (2003), ao utilizarem enxertos com anastomose vascular ou retalhos pediculados na cicatrização de feridas refratárias causadas por injúria elétrica, avulsão do escalpe, úlceras por radiação com severa infecção e necrose tecidual ou ainda neoplasias no esterno.

Sobre a fibrose (figura 21B), não houve diferença significativa nos escores encontrados entre os grupos, seja na fase de proliferação (OM7/CT7) ou na fase de remodelamento (OM14/CT14). Era esperado que o omento estimulasse a formação de tecido cicatricial, por seus vários fatores de crescimento presentes e células inflamatórias dos milky spots, entretanto não foi confirmada a hipótese neste modelo experimental, contrariando o descrito por Saifzadeh, Hobbenaghi, Asadolahi (2009) que descreveram haver marcado grau de fibrose nos animais tratados com enxerto autólogo omental sem anastomose sobre feridas esofágicas.

A presença de células tronco no enxerto omental, assim como células moduladoras da resposta imune, pode favorecer a formação menor de fibrose e conseqüentemente modular a regeneração, entretanto, deve-se considerar que a formação precoce de fibrose favorece o aumento da força tênsil no local da ferida e a migração epitelial, que promove fechamento precoce do meio interno, características benéficas para a preservação da vida.

Em medicina veterinária, diferente da medicina humana, pouca atenção tem sido dada à perda de função ou estética indesejada por fibrose nas resoluções de feridas em animais, devendo ser um campo a ser considerado em futuro próximo, a fim de direcionar a resposta para a regeneração e não simplesmente para a formação de tecido cicatricial.

Nossos achados histopatológicos dos animais tratados evidenciaram a formação de fibrose, com incorporação do enxerto ao tecido de granulação, de forma similar ao descrito por Claro Júnior e colaboradores (2014), ao utilizarem retalho de omento no subcutâneo de ratas, avaliados por coloração HE, após oito semanas da cirurgia. A figura 21B mostra a formação de tecido cicatricial, em animal do grupo tratado sete dias após a cirurgia de implante do enxerto livre, podendo ser observado como o omento foi infiltrado por tecido conjuntivo. A deposição precoce de matriz de conjuntivo tem como principal efeito benéfico o aumento da resistência tênsil e é vista como característica desejável na avaliação de cicatrização.

A formação de fibrose está associada à produção de cicatriz na lesão e Guntner e colaboradores (2008) discutiram se o controle e retardo da formação de fibrose seria uma forma de manipular o processo de cicatrização de feridas em mamíferos, de modo que este mude para a regeneração no qual as células multipotentes possam viabilizar a regeneração do tecido em vez da produção de cicatrizes, muitas vezes limitantes e esteticamente desagradáveis. Neste contexto, o uso do enxerto aqui apresentado poderia auxiliar por meio das células omentais, com características de células mesenquimais, sem entretanto ter sido visto em nossos resultados da histopatologia evidências de regeneração.

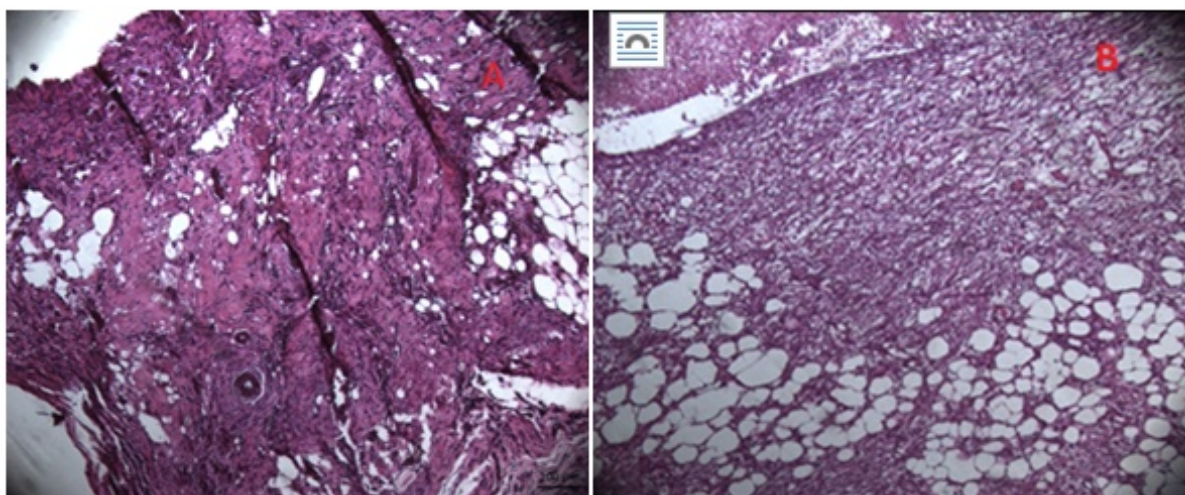


Figura 21. Avaliação histopatológica de lesão cutânea em rato tratado com enxerto omental livre, sem anastomose vascular, demonstrando a necrose (OM14) e fibrose (OM7). (A) extensa área de necrose em omento, coloração HE, objetiva 20x. (B) tecido cicatricial extenso caracterizando fibrose, coloração HE, objetiva 10x.

Outros achados relevantes foram presença de infecção e de hemorragia, conforme demonstrados na figura 22. Liebermann-Meffert (2000); Liebermann-Meffert; White (2012); Koppe e colaboradores (2014) descreveram a capacidade do omento de promover hemostasia,

em órgãos tão irrigados quanto fígado e baço, com parada do estado hemorrágico em curto espaço de tempo, tendo sido este efeito associado à capacidade do omento de promover a ativação de protrombina, como já discutido no item 5.1 (Avaliações macroscópicas e morfométricas), entretanto no presente trabalho, dois animais do grupo tratado OM7 apresentaram extensa área de hemorragia no exame histopatológico, não sendo possível confirmar este efeito benéfico do enxerto omental. Quadro de hemorragia no histopatológico ocorreu em dois animais dos sete operados no grupo CT7.

Ao utilizar esses dados juntamente com o observado nas avaliações macroscópicas (Anexo C), em que 10 animais dos grupos tratados tiveram hemorragia descrita na ferida no pós-operatório imediato, pode-se concluir que no modelo utilizado não foi observada a característica de hemostasia atribuída ao omento.

A presença de infecção nas avaliações clínicas e de colônias bacterianas na avaliação histopatológica em três animais dos grupos tratados parece diferir dos trabalhos de Meza-Perez; Randall (2017) e Liebermann-Meffert; White (2012) sobre a participação do omento na imunidade local e de Song (1989), que descreveu o uso de enxerto omental sem anastomose em feridas infectadas de tecidos moles e ossos em pacientes humanos, com sucesso terapêutico, sendo uma indicação descrita para tratamento de ferimentos gravemente infeccionados, como opção à amputação. A presença de grande número de células de defesa inata e específica no tecido omental, em número aumentado quando em ambiente inflamado, não promoveu o controle de processos infecciosos, mas deve-se considerar que os animais foram mantidos em ambiente contaminado e sem uso de antibióticos, como discutido anteriormente (5.1 Avaliações macroscópicas e morfométricas).

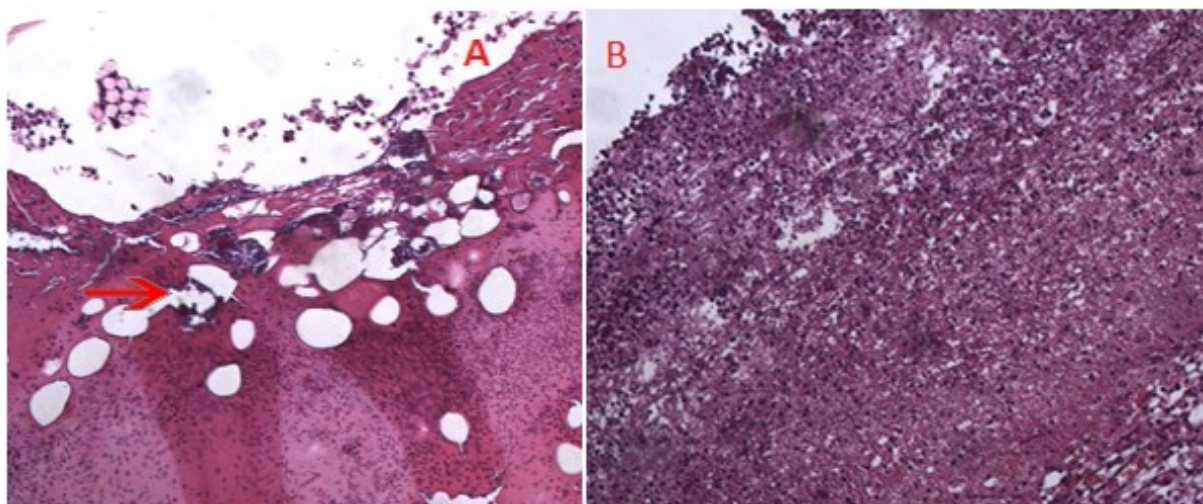


Figura 22. Avaliação histopatológica de lesão cutânea em rato tratado com enxerto omental livre, sem anastomose vascular (OM7), evidenciando-se presença de bactérias e hemorragia. (A) focos discretos de substância amorfa fortemente basofílica sugestivo de colônia bacteriana (seta) em meio a extensa área de necrose e moderada presença de infiltrado inflamatório misto, coloração HE, objetiva 20x. (B) extensa área de hemorragia em meio a moderado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário em tecido omental na ferida, coloração HE, objetiva 20x.

Tabela 5. Resultados da avaliação estatística pelo Teste de Mann-Whitney de comparação entre características histopatológicas na cicatrização de feridas cutâneas de ratos saudáveis, com e sem o uso de enxerto omental sem anastomose vascular.

	Infiltrado Neutrofílico		Infiltrado Mononuclear		Neovascularização		Edema		Necrose		Fibrose	
	OM	CT	OM	CT	OM	CT	OM	CT	OM	CT	OM	CT
7 dias	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$
	3,143	3,000	1,000	1,714	1,143	0,714	0,142	0,0	3,286	3,143	3,143	3,143
	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$
	0,690	1,000	1,291	1,496	0,899	0,488	0,378	0,0	0,755	1,069	0,690	0,690
	p = > 0,9999 ns		p = 0,399 ns		p = 0,469 ns		p = > 0,999 ns		p = > 0,999 ns		p = > 0,999 ns	
14 dias	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$	$\bar{X} =$
	1,571	0,714	2,286	0,857	1,000	0,428	1,286	0,142	1,143	0,571	2,286	2,000
	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$	$\sigma =$
	1,512	1,254	1,254	0,899	1,291	0,786	1,254	0,378	1,464	0,975	0,755	0,577
	p = 0,396 ns		p = 0,0437 *		p = 0,486 ns		p = 0,069 ns		p = 0,486 ns		p = 0,494 ns	

$\bar{X}$  = média,  $\sigma$  = desvio padrão, p = probabilidade de significância, ns = não significativo, \* = significativo, OM = Grupo omento, CT = Grupo controle.

### 5.3 PCR e Imunohistoquímica

No presente projeto, as técnicas de reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) e Imunohistoquímica foram utilizadas para avaliar a participação do enxerto omental autólogo, sem anastomose vascular, na cicatrização cutânea, mensurando-se colágeno, citocinas e fatores de crescimento importantes para a resolução de feridas. A quantificação dos níveis de mRNA por RT-PCR é um método sensível, que permite a análise da expressão de genes a partir de quantidades bastante reduzidas de RNA, enquanto a técnica de imunohistoquímica é utilizada rotineiramente em muitos laboratórios veterinários para fins de diagnóstico e pesquisa, tendo havido melhora na capacidade de detectar antígenos em amostras de tecidos, principalmente em peças conservadas em formaldeído, que possui efeitos indesejados sobre a reação antígeno-anticorpo, por alterar a forma dos epítopos e consequentemente fornecendo resultados falso-negativos.

#### 5.3.1 Colágeno

Foram quantificadas a expressão gênica de colágeno tipo III aos sete e 14 dias e também identificados no foco das feridas, por IH, a quantidade de colágeno tipo I e III aos 14 dias, por serem importantes na cicatrização, ao promoverem aumento de resistência à tração no local lesionado. A hipótese proposta, de que o enxerto omental livre estimularia a síntese de maior quantidade de colágenos I e III nas fases de proliferação e de inflamação, respectivamente, não foi confirmada, por não haver diferença estatística significativa entre os grupos tratados e controles, tanto na expressão dos genes de síntese do colágeno III, quanto na quantificação de colágeno I e III aos 14 dias, através de IH, conforme figuras 23 e 24, o que confirma achados histopatológicos de fibrose, sem diferença significativa nos escores entre os grupos, na fase de proliferação e também na de remodelamento.

Quanto ao colágeno III, a expressão gênica por RT-PCR e a avaliação por IH demonstraram que houve síntese e deposição deste colágeno aos sete dias e quantidades similares ao controle aos 14 dias, conforme figuras 23 e 25C/D. Clore; Cohen; Diegelmann (1979) descreveram que a maior produção deste colágeno ocorre em até 24 horas após lesão cutânea em ratos, reduzindo-se gradativamente até que aos sete dias, é encontrado em quantidade similar à pele normal, em torno de 20%.

Os resultados descritos diferem dos achados de Azari e colaboradores (2012) que descreveram a maior deposição de colágeno com o uso de enxerto omental livre autólogo em cães, avaliados pela técnica de tricrômico de Masson para colágeno. Ao se utilizar o omento

em feridas, tem-se a expectativa de maior produção de colágenos, por sabidamente haver maior síntese de citocinas pró-fibróticas neste tecido, como FGF. No presente experimento, não houve diferença significativa, não se confirmando a hipótese de que o omento aumentaria a produção de fibras colágenas, no modelo de feridas cutâneas agudas em ratos.

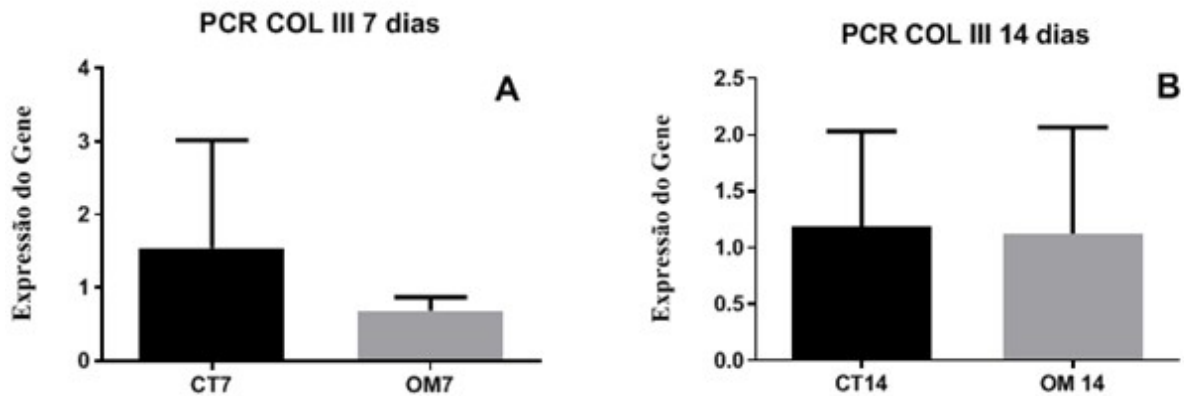


Figura 23. Expressão gênica do colágeno tipo III em lesões cutâneas agudas em ratos tratados com enxerto omental livre, sem anastomose vascular e controles. (A) Comparação entre grupos CT7 e OM7 (Controle  $1,545 \pm 1,472$  vs Omento  $0,684 \pm 0,183$ ,  $p = 0,6154$ ). (B) Comparação entre grupos CT14 e OM14 (Controle  $1,192 \pm 0,839$  vs Omento  $1,124 \pm 0,943$ ,  $p = 0,4156$ ).

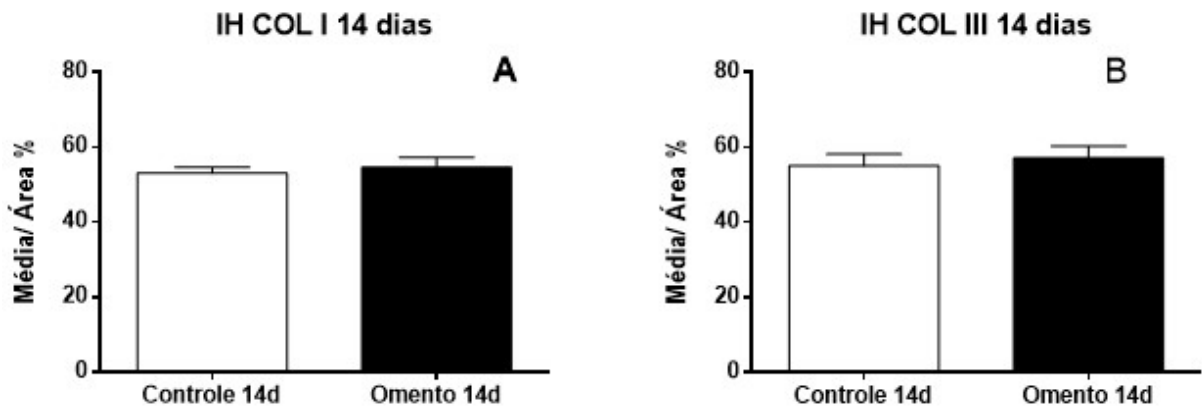


Figura 24. Mensuração do Colágeno tipo I e tipo III, por imunohistoquímica, em lesões cutâneas agudas em ratos tratados com enxerto omental livre, sem anastomose vascular e controles. (A) Comparação entre grupos OM14 e CT14, quanto a colágeno tipo I (Controle  $53,33 \pm 7,76$  vs Omento  $53,04 \pm 11,20$ ,  $p = 0,1834$ ). (B) Comparação entre grupos OM14 e CT14, quanto a colágeno tipo III (Controle  $55,10 \pm 11,82$  vs Omento  $57,14 \pm 12,27$ ,  $p = 0,8919$ ).

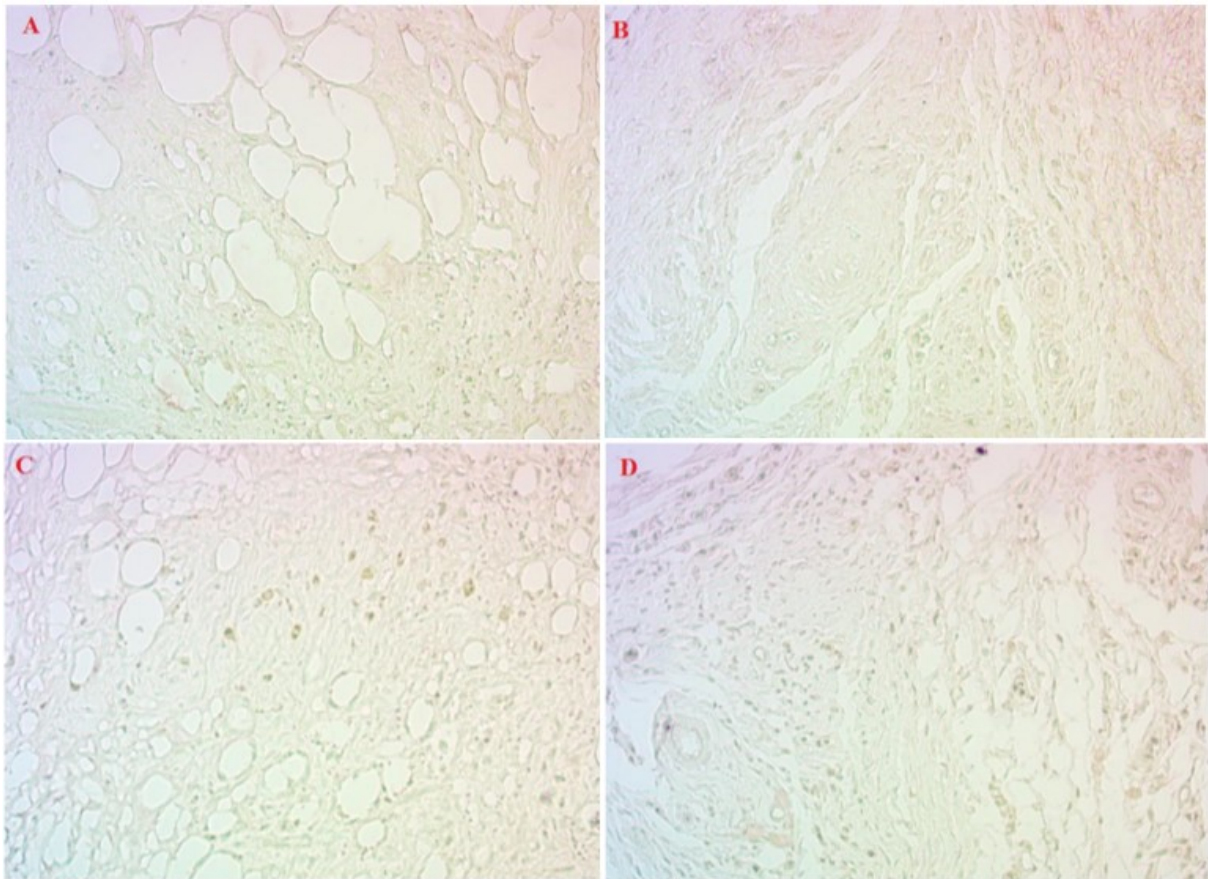


Figura 25. Imunohistoquímica de tecido de granulação de lesões cutâneas de ratos, nos grupos controles e tratados com enxerto omental livre, aos 14 dias após a lesão. A. Omento – colágeno tipo I; B. Controle – colágeno tipo I; C. Omento – colágeno tipo III e D. Controle – colágeno tipo III, objetiva 20x.

### 5.3.2 Fatores de crescimento

#### 5.3.2.1 Fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF)

O VEGF foi quantificado a fim de confirmar ou não a hipótese de que o uso de enxerto de omento não pediculado e sem anastomose vascular poderia modular a produção desta citocina no foco da lesão em pele de rato. O VEGF tem sido quantificado em trabalhos sobre cicatrização, por ser um potente agente mitogênico para as células endoteliais, induzindo desta forma a neovascularização do foco da ferida, fornecimento de  $O_2$  e nutrientes em um ambiente anabólico, além disso, também atua como um fator de sobrevivência para as células endoteliais inibindo sua apoptose, e ainda favorece a migração de queratinócitos por induzir a substituição de fibrina por tecido de granulação, como descrito por Barrientos e colaboradores (2008); Gurtner e colaboradores (2008).

Em nosso estudo foi realizada quantificação da expressão do gene de VEGF, aos sete e aos 14 dias (figura 26), sem haver diferença significativa em ambos os momentos (d7 - CT

0,829 ± 0,419 vs OM 0,606 ± 0,378, p= 0,0898 e d14 - CT 0,854 ± 0,502 vs OM 1,404 ± 0,668, p= 0,1508). Foi quantificada por IH a presença deste fator de crescimento nas feridas cirúrgicas aos 14 dias (figuras 27 e 28), não havendo diferença estatística significativa (CT 49,58 ± 8,19 vs OM 52,30 ± 9,11, p = 0,6975). Estes achados são contrários aos descritos na literatura, quanto à produção de VEGF no tecido do omento, tais como no trabalho de Litbarg e colaboradores (2007) que descreveram que uma vez ativado por corpo estranho intra-abdominal, o omento expande seu tamanho no período de uma semana e a produção de VEGF aumenta até 3,5 vezes, comparado com o omento não ativado. Como o omento ativado pelo povidextrano expandiu em 20 vezes a massa, o conteúdo total do VEGF foi proposto como tendo aumentado em 70 vezes. Singh e colaboradores (2008) estudaram a produção de VEGF em cultura celular de estroma omental, utilizando ELISA e concluíram que a síntese de VEGF era 10 a 20 vezes maior neste meio que nas culturas utilizadas como controle, característica que se manteve mesmo após mais de 10 passagens no cultivo celular.

Mesmo levando-se em consideração as diferenças entre o modelo experimental do presente estudo e aqueles utilizados pelos autores citados acima, era esperado que a presença do enxerto livre de omento tivesse estimulado a produção de VEGF, assim como o aumento da angiogênese na análise histopatológica, quando comparado aos grupos controles, uma vez que trabalhos com enxerto livre sem anastomose vascular, como o de Oloumi e colaboradores (2006) em fraturas tibiais, comprovaram formação de neovascularização significativa aos 14 dias.

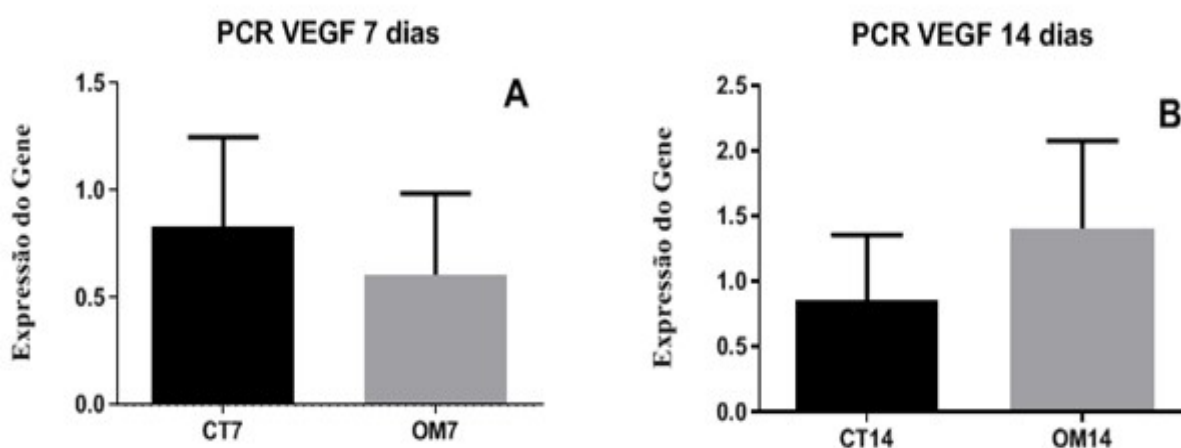


Figura 26. Expressão gênica do Fator de Crescimento de Endotélio Vascular (VEGF) em lesões cutâneas agudas em ratos tratados com enxerto omental livre, sem anastomose vascular e controles. (A) Comparação entre grupos OM7 e CT7 - Controle 0,829 ± 0,419 vs Omento 0,606 ± 0,378, p = 0,0898. (B) Comparação entre grupos OM14 e CT14 - Controle 0,854 ± 0,502 vs Omento 1,404 ± 0,668, p = 0,1508.



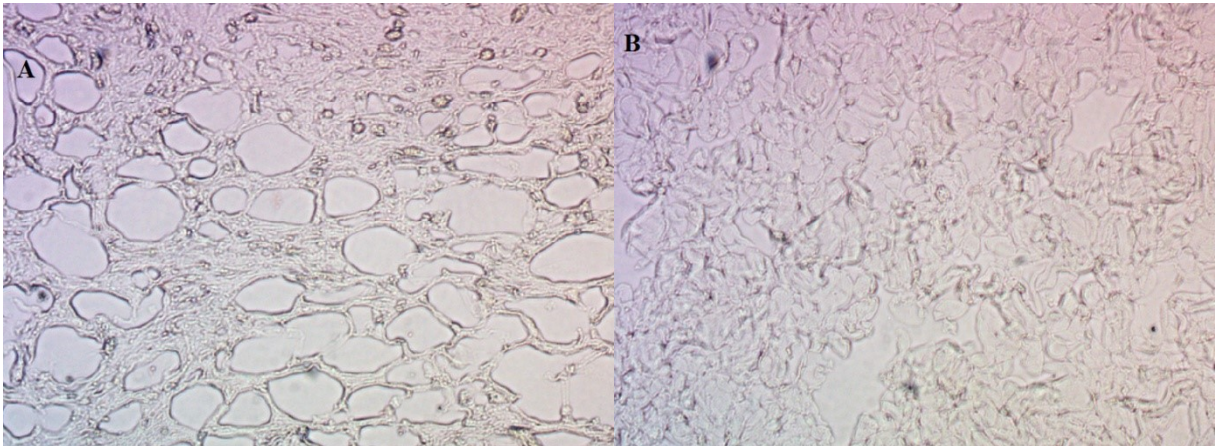


Figura 27. Imunohistoquímica de tecido de granulação de lesões cutâneas de ratos, nos grupos controles e tratados com enxerto omental livre, aos 14 dias após a lesão, para fator de crescimento de endotélio vascular. A. Omento; B. Controle, objetiva 20x.

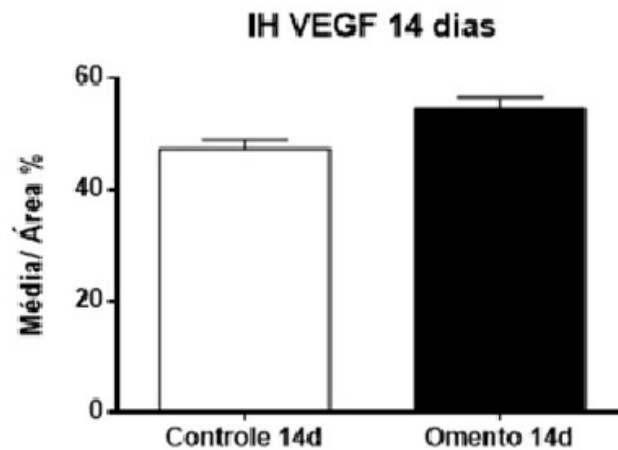


Figura 28. Mensuração do Fator de Crescimento de Endotélio Vascular (VEGF), por imunohistoquímica, em lesões cutâneas agudas em ratos tratados com enxerto omental livre, sem anastomose vascular e controles. Comparação entre grupos OM14 e CT14 - CT  $49,58 \pm 8,19$  vs OM  $52,30 \pm 9,11$ ,  $p = 0,6975$ .

### 5.3.2.2 Fator de Crescimento de Fibroblastos 2 (FGF2)

Considerando-se que a literatura disponível descreve que FGF2 está aumentado em feridas cutâneas, com atividade mitogênica sobre várias células, principalmente nas fases iniciais da cicatrização (WERNER; GROSE, 2003; PLATELL et al., 2000); que isquemia muscular induz a sua expressão, como mecanismo de angiogênese (WALGENBACH et al., 1995); que o implante de omento em modelos de cicatrização gástrica em ratos demonstrou que a angiogênese também é mediada por este polipeptídeo (MATOBA; KATAYAMA; OHAMI, 1996) e que, segundo Gurtner e colaboradores (2008), é considerado um dos reguladores mais importantes da angiogênese, juntamente com o VEGFa, decidimos avaliar se

o enxerto omental livre foi capaz de interferir na síntese de FGF2 quando utilizado sobre feridas cutâneas agudas.

Em nossos resultados, obtidos através de quantificação de mRNA para FGF aos sete e aos 14 dias após a realização de lesão cutânea, não houve diferença estatística entre os grupos tratados e os seus controles (d7 - CT  $1,385 \pm 1,234$  vs OM  $0,721 \pm 0,318$   $p= 0,6154$ , d14 - CT  $0,806 \pm 0,266$  vs OM  $0,652 \pm 0,293$ ,  $p= 0,8527$ ). Diferente do esperado, a produção de FGF não se modificou quando a ferida cutânea foi exposta ao tecido omental (figura 29), suas células e seus fatores de crescimento. O omento é rico em macrófagos e uma vez ativado, aumenta consideravelmente o tecido do estroma, rico em FGF, mas sem alteração na quantidade de adipócitos, como descrito por Litbarg e colaboradores (2007). As fases propostas no experimento, de transição da inflamação para proliferação (sete dias) e desta para a maturação (14 dias), deveriam diferir quanto à expressão de FGF, com maior quantidade no primeiro, entretanto, não foi observado este padrão no presente experimento, quanto aos grupos tratados.

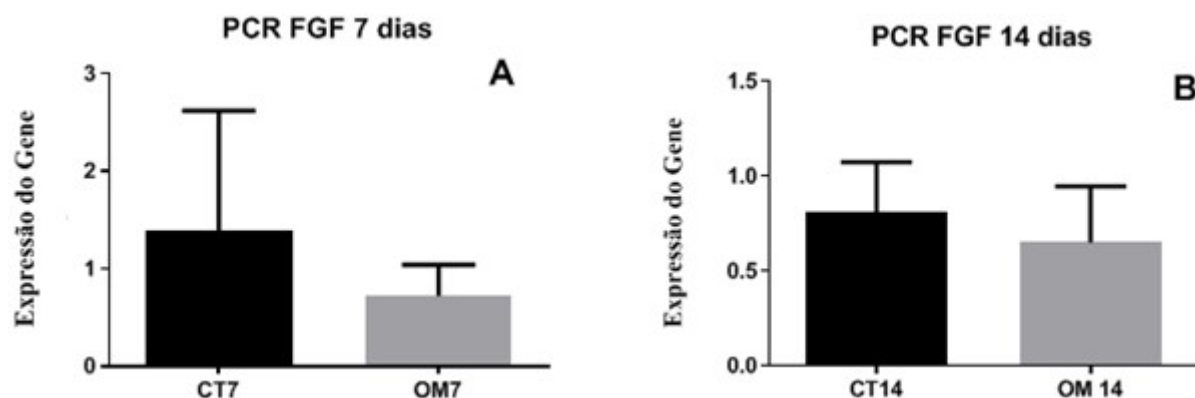


Figura 29. Expressão gênica do Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF2) em lesões cutâneas agudas em ratos tratados com enxerto omental livre, sem anastomose vascular e controles. (A) Comparação entre grupos OM7 e CT7 – CT  $1,385 \pm 1,234$  vs OM  $0,721 \pm 0,318$   $p= 0,6154$ . (B) Comparação entre grupos OM14 e CT14 (CT  $0,806 \pm 0,266$  vs OM  $0,652 \pm 0,293$ ,  $p= 0,8527$ ).

### 5.3.2.3 Fator de crescimento transformador- $\beta$ (TGF- $\beta$ )

A análise imunohistoquímica das peças histológicas permitiu quantificar TGF- $\beta$  em nosso experimento, com diferença significativa entre os controles e os tratados com o omento em 14 dias (figuras 30 e 31) (CT  $58,58 \pm 21,52$  vs OM  $51,36 \pm 8,12$ ,  $p = 0,0008$ ).

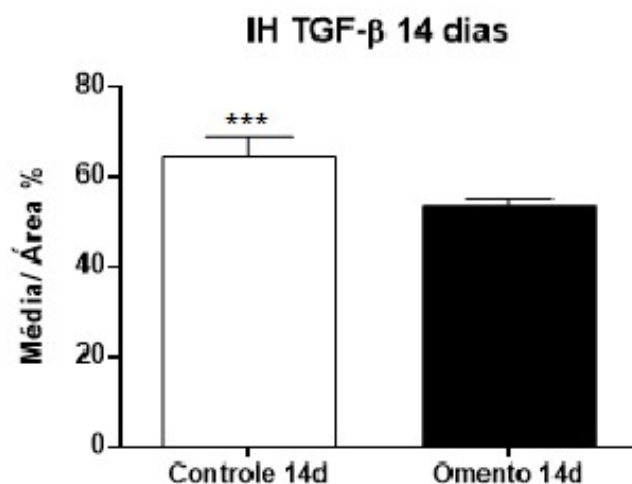


Figura 30. Mensurações por meio de Imunohistoquímica de Fator de Crescimento Transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) em lesões cutâneas agudas em ratos tratados com enxerto omental livre, sem anastomose vascular e controles. Comparação entre grupos OM14 e CT14 (CT  $58,58 \pm 21,52$  vs OM  $51,36 \pm 8,12$ ,  $p = 0,0008$ ). \*\*\* diferença significativa entre os grupos.

Por seus variados efeitos no processo cicatricial, como neovascularização, proliferação de fibroblastos, diferenciação destes em miofibroblastos e deposição de matriz, TGF-  $\beta$  tem sido a citocina mais estudada no reparo de feridas (KWAN; TREDGET, 2017; GOLDBERG et al, 2007; WERNER; GROSE, 2003) e por ser uma citocina pró-fibrótica e liberada por muitos tipos celulares no foco da ferida, pode-se avaliar que ao apresentar valores de TGF- $\beta$  menores que os controles, mas uma quantidade maior de células mononucleares (monócitos e macrófagos), as feridas tratadas com o enxerto de omento livre estão em uma fase do reparo de feridas mais precoce, ou seja, provavelmente ainda encontram-se em fase inflamatória, com muita celularidade e menor quantidade desta citocina.

Aos 14 dias seria esperado uma maior deposição de matriz extracelular e diminuição do número de células, sejam inflamatórias ou até da neovascularização e fibroblastos. Neste momento deveria estar ocorrendo a transição para fase de maturação, na qual é esperada a reorganização do colágeno, com aumento da força tênsil e não mais a presença de células. Seria interessante diferenciar a polarização dos macrófagos encontrados nas feridas, tanto dos controles quanto nos tratados, a fim de verificar se o perfil é M1 (inflamatório), secretor de IL-1 e TNF- $\alpha$  ou M2 (anti-inflamatório) secretor de IL-10 e TGF- $\beta$  (STRAYER; RUBIN, 2015; MANTOVANI et al, 2004), o que não foi avaliado em nosso trabalho. Desta forma, considerando apenas os resultados disponíveis, o omento pode ter atrasado a cicatrização nos grupos tratados, por prolongar a fase inflamatória do reparo das feridas agudas em ratos.

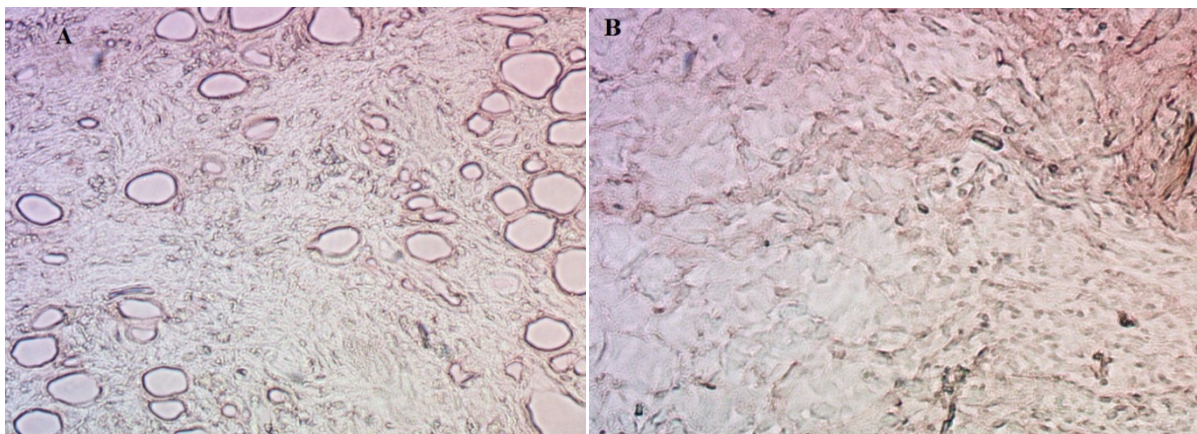


Figura 31. Imunohistoquímica de tecido de granulação de lesões cutâneas de ratos, nos grupos controles e tratados com enxerto omental livre, aos 14 dias após a lesão, para fator de crescimento transformador  $\beta$ . A. Omento; B. Controle, objetiva 20x.

Vários trabalhos demonstraram a capacidade do omento de promover a cicatrização em órgãos diversos (THOMPSON; POLLOCK, 1945; CANNADAY, 1948; GOLDSMITH, 1968, 1973; BORNEMISZA et al, 1987; SONG, 1989; LIEBERMANN-MEFFERT, 2000; SHEN; SHEN, 2003; OLOUMI et al, 2006; LITBARG et al, 2007; SAIFZADEH et al, 2009a,b; AZARI et al, 2012; MAZZAFERRO et al, 2017; MEZA-PEREZ; RANDALL, 2017), não sendo, entretanto, descrito o seu uso em lesões cutâneas em ratos.

Alguns pontos devem ser discutidos quanto aos resultados obtidos, considerando-se as técnicas utilizadas para quantificar o processo cicatricial com e sem o uso de enxerto livre de omento. A ativação do tecido doador, neste caso o omento, previamente à sua implantação no leito receptor, como realizado em plasma rico em plaquetas (PRP), poderia aumentar a produção de polipeptídeos locais como VEGF e FGF, podendo ser objeto de estudo em futuro próximo. O PRP tem sido largamente utilizado em medicina veterinária e humana, como promotor de cicatrização por liberação de citocinas e fatores de crescimento, exatamente os mesmos mecanismos incriminados no uso do omento.

Outro ponto importante sobre o presente trabalho é a mensuração de áreas das lesões, uma vez que houve aumento do tecido implantado, exatamente como descrito por Litbarg e colaboradores (2007), que demonstraram que o omento ativado aumenta em tamanho e massa, principalmente devido a células do estroma e não adiposas. Para comparação, o omento em seu estado não ativado é composto de até 95% de tecido adiposo, entretanto, uma vez ativado, estas diminuem para menos de 30%, sendo todo o restante composto por células inflamatórias e células que expressam marcadores para células tronco. Nas mensurações das áreas das lesões, houve o recobrimento das bordas das lesões nos grupos tratados, principalmente nas

primeiras imagens obtidas (dias três e sete), devido ao aumento de volume do tecido do enxerto, o que dificultou a determinação das bordas das feridas e conseqüentemente das mensurações e resultados obtidos na avaliação macroscópica.

A ressaltar ainda, que a utilização de enxerto sem anastomose não requereu nenhum treinamento ou equipamentos especializados para realizar os procedimentos cirúrgicos. A necessidade de microscópio cirúrgico, material de sutura 9-0 a 11-0, instrumentos para microcirurgia, entre outros materiais, são fatores limitantes para o uso do enxerto com anastomose vascular, conforme descrito por Fossum (2007). A necessidade de vasos de tamanhos similares tanto no enxerto quanto no leito receptor é outro fator a ser considerado no enxerto com anastomose. Um enxerto omental vascularizado é tecnicamente mais difícil e com maior taxa de falha, devido a erros na preparação vascular e anastomoses, sendo que enxertos omentais livres podem exercer efeitos benéficos na cicatrização mesmo sem microanastomose vascular, como descrito por Saifzadeh; Hobbenaghi; Asadolahi (2009).

O interesse pela utilização do enxerto omental livre sem anastomose ressurgiu há pouco mais de uma década (TEIXEIRA, 2018; AZARI et al., 2012; SAIFZADEH; HOBHENAGHI; ASADOLAH, 2009; SAIFZADEH et al., 2009; OLOUMI et al., 2006; BORNEMISZA et al., 1987) e, portanto, pouco ainda se sabe sobre sua melhor forma de utilização e seu efetivo potencial de estímulo ao reparo de tecidos lesados. Nenhum trabalho foi encontrado com relato de seu uso para auxílio na cicatrização de pele em feridas abertas, conforme foi utilizado no presente estudo, e a única experiência relatada em feridas cicatrizando por primeira intenção é bem recente (TEIXEIRA, 2018), oriunda de nosso grupo de pesquisa, o que abre um grande campo de possibilidades de estudo, com motivação na praticidade e segurança de sua utilização.

A expectativa da obtenção de alguns resultados, como o estímulo à angiogênese e produção de seus fatores relacionados (VEGF e FGF2), maior quantidade de colágeno e incremento na retração da ferida, não foi aqui alcançada. Entretanto, deve-se considerar que estes dados são embasados nos relatos de outras formas de utilização do omento (retalho e enxerto livre vascular) ou na aplicação do enxerto livre sem anastomose em outros tecidos (osso e esôfago) e, portanto, outros aspectos do processo cicatricial ainda podem ser investigados, como o envolvimento de variadas células e moléculas importantes na complexa “cascata” da cicatrização.

Como possível continuidade desta linha de pesquisa, o uso em cicatrização de tecido omental livre, sem anastomose vascular, poderá ser avaliado em feridas de difícil resolução,

como descrito em trabalhos anteriores com excelentes resultados do enxerto pediculado (MAZZAFERRO et al., 2017; FALCÃO et al., 2016; FERRIGNO et al., 2010; CIUCE et al., 2003; LOSKEN; CARISON; CULBERTSON, 2002; LASCELLES; WHITE, 2001). Neste experimento, o enxerto omental livre foi utilizado em feridas agudas de ratos jovens e saudáveis, entretanto poderia ser testada a mesma hipótese da influência do omento sobre ratos diabéticos ou em modelos de feridas isquêmicas, sabidamente com dificuldade de cicatrização.

## 6 CONCLUSÕES

A utilização do omento livre autólogo sem anastomose vascular na cicatrização cutânea é viável, não tendo ocorrido rejeição, perda do enxerto ou prejuízo à cicatrização nas lesões agudas avaliadas macroscopicamente em ratos saudáveis.

Não houve diferença estatística entre os grupos tratados e controles quanto à avaliação morfométrica das lesões cutâneas em ratos, devendo ser ressaltado o aumento de volume do enxerto nos grupos com omento, justificado pela ativação celular deste órgão em ambiente inflamado.

As características histopatológicas dos grupos tratados diferiram dos controles estatisticamente quanto ao infiltrado mononuclear, sendo maior nos animais tratados aos 14 dias de pós-cirúrgico.

Não houve diferença significativa na deposição de colágenos tipo I e tipo III entre feridas cutâneas com o uso de enxerto omental livre e seus controles, não sendo possível afirmar que o omento promoveu maior produção de colágenos.

Quanto às avaliações de fatores de crescimento, não foi confirmado o aumento esperado na produção de VEGF e FGF e houve a menor produção de TGF- $\beta$  nos animais tratados aos 14 dias.

Pode-se concluir que o omento não acelerou a cicatrização cutânea em ratos no modelo de feridas agudas, com aumento de infiltrado mononuclear e diminuição de TGF- $\beta$  aos 14 dias.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGALAR, F.; SAYEK, I.; CAKMAKCI, M.; HASCELİK, G.; ABBASOĞLU, O. Effect of omentectomy on peritoneal defense mechanisms in rats. **The European Journal of Surgery**, v. 163, n. 8, p. 605 – 609, 1997.

AMADEU, T. P.; SEABRA, A. B.; OLIVEIRA, M. G.; COSTA, A. M. A. S-nitrosoglutathione-containing hydrogel accelerates rat cutaneous wound repair. **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 21, p. 629 – 637, 2007.

ALAGUMUTHU M.; DAS BHUPATI, B.; PATTANAYAK S. P.; RASANANDA M. The omentum: A unique organ of exceptional versatility, **Indian Journal of Surgery**, v. 68, n. 3, p. 136 – 141, 2006.

AZARI, O.; MOLAEI, M. M.; KHEIRANDISH, R.; ALIABAD, S. H.; SHADDEL, M. Effect of autologous omental free graft on wound healing process in experimental cervical oesophagus incision in dog: short-term preliminary histopathological study. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, p. 559 – 563, 2012.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M. S.; BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**; v. 16, p. 585-601, 2008.

BATISTA, C. A. M.; COLLEONI, N., RAMIRO, L. F.; de JESUS, G. Comparative study of the healing process of the aponeurosis of the anterior abdominal wall of rats after wound closure using 3-0 nylon suture and N-butyl-2-cyanoacrylate tissue adhesive. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 352 – 363, 2008.



BÉNÉZECH, C.; LUU, N.; WALKER, J. A.; KRUGLOV, A. A.; LOO, Y.; NAKAMURA, K.; ZHANG, Y.; NAYAR, S.; JONES, L. H.; FLORES-LANGARICA, A.; MCINTOSH, A.; MARSHALL, J.; BARONE, F.; BESRA, G.; MILES, K.; ALLEN, J. E.; GRAY, M.; KOLLIAS, G.; CUNNINGHAM, A. F.; WITHERS, D. R.; TOELLNER, K. M.; JONES, N. D.; VELDHOFEN, M.; NEDOSPASOV, S. A.; MCKENZIE, A. N. J.; CAAMAÑO, J. H. Inflammation-induced formation of fat-associated lymphoid clusters, **Nature Immunology**, v. 16, n. 8, p. 819 – 828, 2015.

BLIKSLAGER, A. T.; WHITE II, N. A.; MOORE, J. N.; MAIR, T. S. The Equine Acute Abdomen, 3<sup>rd</sup> Ed, Wiley Blackwell, 904 p, 2017.

BOHLING, M. W.; HENDERSON, R. A., Differences in cutaneous wound healing between dogs and cats, **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practices**, v. 36, p. 687 – 692, 2006.

BORNEMISZA, G.; TARSOLY, E.; FURKA, I.; MIKÓ, I. Experimental study of autologous free omental grafts. **Acta Chirurgica Hungarica**, v. 28, n. 4, p. 299 – 307, 1987.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7SUPPL, p. 12 – 34, 2006.

CANNADAY, J. E. Some uses of undetached omentum in surgery. **American Journal of Surgery**, v. 76, p. 502 – 505, 1948.

CHANDRA, A.; SRIVASTAVA, R. K.; KASHYAP, M. P.; KUMAR, R.; SRIVASTAVA, R. N.; PANT, A. B. The anti-inflammatory and antibacterial basis of human omental defense: selective expression of cytokines and antimicrobial peptides. **PlosOne**, v. 6, n. 5, p. 1 – 11, 2011.

CHILDS, D. R.; MURTHY, A. S. Overview of Wound Healing and Management. **Surgical Clinics of North America**, v. 97, n. 1, p. 189 – 207, 2017.

CIUCE, C.; SEDDIQ, F.; FODOR, M.; CONSTATINESCU, D.; TODORAN, M.; ANDERCOU, A.; DENCO, D. Omental free-tissue transfer: indications and results from personal experience. **Microsurgery**, v. 23, n. 3, p. 198 – 205, 2003.

CLARK, R. A. F. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations I. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 13, p. 701-725, 1985.

CLARO JÚNIOR, F.; MOREIRA, L. R.; STOCCHERO, G. F.; PINTO, G. A.; PINTO-NETO, A. M. Retalho autólogo de grande omento como estrutura cirúrgica de reparo extraperitoneal. Estudo experimental comparativo, pareado e controlado de suas propriedades adaptativas, **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 29, n. 1, p. 128 – 135, 2014.

CLORE, J. N.; COHEN, I. K.; DIEGELMANN, R. F. Quantitation of collagen types I and III during wound healing in rat skin, **Proceedings of the society for experimental biology and medicine**, v. 161, p. 337 – 340, 1979.

DOOM, M.; ROOSTER, H.; van BERGEN, T.; GIELEN, I.; KROMHOUT, K.; SIMOENS, P.; CORNILLIE, P. Morphology of the canine omentum part 1: arterial landmarks that define the omentum, **Anatomia Histologia Embryologia**, n. 45, p. 37 – 43, 2016.

DUNKIN, C. S. J.; PLEAT, J. M.; GILLESPIE, P. H.; TYLER, M. P. H.; ROBERTS, A. H. N.; MCGROUTHER, D. A. Scarring occurs at a critical depth of skin injury: precise measurement in a graduated dermal scratch in human volunteers, **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 119, n. 6, p. 1722 – 1732, 2007.

ECKERSLEY, J. R. T.; DUDLEY, H. A. F. Wound and wound healing. **British Medical Bulletin**, v. 44, n.2, p. 423-436, 1988.

FALCÃO; M. V. C.; RAMOS, C. V. R.; TEIXEIRA, A. C. S. C.; MOURA, A. P. R.; CORRÊA, C. G.; TEIXEIRA, J. G. C.; HENRIQUES, M. O.; SILVA, M. F. A. Retalho de omento como adjuvante no reparo cutâneo na pseudocicatrização em gatos – Relato de caso, **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, Supl 2, p. 75 – 80, 2016.

FERRIGNO, C. R. A.; ITO, K. C.; CAQUIAS, D. F. I.; MARIANI, T. C.; NINA, M. I. D.; FERRAZ, V. C. M.; CUNHA, O.; ROMANO, L. Retalho de omento maior para indução de vascularização e consolidação óssea em cão. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 2033-2036, 2010.

FOSSUM, T. W. Principles of Plastic and Reconstructive Surgery, in: FOSSUM, T. W. Small Animal Surgery, 3 Ed, Elsevier, p. 192-224, 2007.

FREEMAN, L. The use of free omental grafts in abdominal surgery. **Annals of Surgery**, v. 63, n. 1, p. 83 – 87, 1916.

GALIANO, R. D.; TEPPER, O. M.; PELO, C. R.; BHATT, K. A.; CALLAGHAN, M.; BASTIDAS, N.; BUNTING, S. STEINMETZ, H. G.; GURTNER, G. C. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 6, p. 1935 – 1947, 2004.

GARTNER, L. P., HIATT, J. L. Tratado de Histologia em cores, 3º edição, Elsevier, São Paulo. 2007.

GEORGII, J. L. Efeitos da aplicação tópica da S-Nitrosoglutationa no reparo tecidual de lesões cutâneas isquêmicas, Dissertação de mestrado em Biologia Humana e Experimental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 60 p., 2011.

GOLDBERG, M. T.; HAN, Y.; Yan, C.; SHAW, M. C.; GARNER, W. L. TNF- $\alpha$  Suppresses  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Expression in Human Dermal Fibroblasts: An Implication for Abnormal Wound Healing, **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 11, p. 2645 – 2655, 2007.

GOLDSMITH, H. S. Pedicled Omentum versus Free Omental Graft for Myocardial Revascularization, **Diseases of the Chest**, v. 54, n. 6, p. 523 – 526, 1968.

GOLDSMITH, H. S.; CHEN, W.; DUCKETT, S. W., Brain vascularization by intact omentum, **Archives of Surgery**, v. 106, n. 5, p. 695 – 698, 1973.

GOLDSMITH, H. S.; DE LOS SANTOS, R.; BEATTIE, E. J. The relief of chronic lymphedema by omental transposition, Annual Meeting of the American Surgical Association, p. 573 – 585, 1967.

GOLDSMITH, H. S.; STEWARD, E.; DUCKETT, S. Early Application of Pedicled Omentum to the Acutely Traumatized Spinal Cord, **Paraplegia**, v. 23, p. 100 - 112, 1985.

GURTNER, G. C; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration, **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314 – 321, 2008.

HOSGOOD, G. The omentum - the forgotten organ: Physiology and potential surgical applications in dogs and cats. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 12, n. 1, p. 45 – 51, 1990.

HUYGHE, S.; de ROOSTER, H.; DOOM, M.; VAN DEN BROECK, W. The Microscopic Structure of the Omentum in Healthy Dogs: The Mystery Unravelling, *Anatomia, Histologia, Embryologia*. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 45, p. 209 – 218, 2015.

IGLESIAS, M.; BUTRÓN, P.; LÉON-LÓPEZ, D. A.; GARCÍA-MANCILLA, S.; ESPINO-GAUCIN, I.; RUBIO, A. Soft Tissue Reconstruction with Omental Free Flap in Complex Upper Extremity Injuries: Report of 13 cases. **Microsurgery**, v. 34, n. 6, p. 425 – 433, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*, 12<sup>a</sup> Ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2013.

KIRPENSTEIJN, J.; HAAR, G., *Reconstructive Surgery and Wound Management of the Dog and Cat*, **CRC Press**, 1st Ed, 240 p., 2013.

KOPPE, M. J.; NAGTEGAAL, I. D.; DE WILT, J. H.; CEELLEN, W. P. Recent insights into the pathophysiology of omental metastases. **Journal of Surgical Oncology**, v. 110, p. 670 – 675, 2014.

KRAHWINKEL, D. J.; BOOTHE, H. W. Topical and systemic medications for wounds, **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 36, p. 739 – 757, 2006.

KUEBELBECK, K. L.; SLONE, D. E.; MAY, K. A. Effect of omentectomy on adhesion formation in horses. **Veterinary Surgery**, v. 27, n. 2, p. 132 – 137, 1998.

KWAN, P. O.; TREDGET, E. E. Biological principles of scar and contracture, **Hand Clinics**, v. 33, n. 2, p. 277 – 292, 2017.

LASCELLES, B. D.; WHITE, R. A. Combined omental pedicle grafts and thoracodorsal axial pattern flaps for the reconstruction of chronic, nonhealing axillary wounds in cats. **Veterinary Surgery**, v. 30, p. 380 - 385, 2001.

LIEBERMANN-MEFFERT, D. The greater omentum: anatomy, embryology and surgical applications. **Surgical Clinics of North America**, v. 80, n. 1, p. 275 – 293, 2000.

LIEBERMANN-MEFFERT, D; WHITE, H. The greater omentum: anatomy, physiology, pathology, surgery with an historical survey. 1<sup>st</sup> Ed, Springer Verlag NY, 392 p., 2012.

LITBARG, N. O.; GUDEHITHLU, K. P.; SETHUPATHI, P.; ARRUDA, J. A. L.; DUNEA, G.; SINGH, A. K. Activated omentum becomes rich in factors that promote healing and tissue regeneration, **Cell and Tissue Research**, v. 328, n. 3, p. 487 – 497, 2007.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 9 – 18, 2007.

LOSKEN, A.; CARISON, G. W.; CULBERTSON, J. H. Omental free flap reconstruction in complex head and neck deformities. **Head Neck**, v. 24, n. 4, p. 326 – 331, 2002.

LOVVORN, H. N.; CHEUNG, D. T.; NIMNI, M. E.; PERELMAN, N.; ESTES, J. M.; ADZICK, N. S. Relative distribution and crosslinking of collagen distinguish fetal from adult sheep wound repair. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 34, n. 1, p. 218 – 223, 1999.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 12, p. 677 – 686, 2004.

MATOBA, Y.; KATAYAMA, H.; OHAMI, H., Evaluation of omental implantation for perforated gastric ulcer therapy: findings in a rat model, **Journal of Gastroenterology**, v. 31, n. 6, p. 777 – 784, 1996.

MAZZAFERRO, D.; SONG, P.; MASSAND, S.; MIRMANESH, M.; JAISWAL, R.; PU, L. L. Q. The Omental Free Flap—A Review of Usage and Physiology, **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 34, n. 3, p.151 – 169, 2017.

McGEADY, T. A.; QUINN, P. J.; FITZPATRICK, E.S.; RYAN, M. T.; KILROY, D.; LONERGAN, P. **Veterinary Embryology**, 2<sup>nd</sup> Ed, Wiley-Blackwell, 385 p., 2017.

McLEAN, D.M., BUNKE H. Autotransplant of the omentum to a large scalp defect with microsurgical revascularization. **Plastic and Reconstructive Surgery**. V. 49, n. 3, p. 268 – 274, 1972.

MEDEIROS, A. C.; DANTAS-FILHO, A. M. Cicatrização de feridas cirúrgicas, **Journal of Surgical and Clinical Research**, v. 7, n. 2, p. 87 – 102, 2016.

MEZA-PEREZ, S.; RANDALL, T. D. Immunological Functions of the Omentum, **Trends in Immunology**, v. 38, n. 7, p. 526 – 536, 2017.

MORAN, W. J.; PANJE, W. R. The free greater omental flap for treatment of mandibular osteoradionecrosis. **Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 113, n. 4, p. 425 – 427, 1987.

MORRISON R. On the functional aspects of the greater omentum. **British Medical Journal**. n. 1, p. 76 – 78, 1906.

NEVES, S. M. P.; ONG, F. M. P.; RODRIGUES, L. D.; SANTOS, R. A.; FONTES, R. S.; SANTANA, R. O. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP, São Paulo: FCF-IQ/USP, 216 p., 2013.

OGLE, M. E.; SEGAR, C. E.; SRIDHAR, S.; BOTCHWEY, E. A. Monocytes and macrophages in tissue repair: Implications for immunoregenerative biomaterial design. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 10, p. 1084 – 1097, 2016.

OLOUMI, M. M.; DERAKHSHANFAR, A.; MOLAEI, M. M.; TAYYEBI, M. The angiogenic potential of autogenous free omental graft in experimental tibial defects in rabbit: Short-term preliminary histopathological study, **Journal of Experimental Animal Science**, v. 43, p. 179 – 187, 2006.

PATEL, N.R.; BOLE, M.; CHEN, C.; HARDIN, C. C.; KHO, A.T.; MIH, J.; DENG, L.; BUTLER, J.; TSCHUMPERLIN, D.; FREDBERG, J.; KRISHNAN, R.; KOZIEL, H. Cell Elasticity Determines Macrophage Function, **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, e41024, 2012.

PAVLETIC, M. M. Miscellaneous Reconstructive Surgical Techniques. In: \_\_\_\_\_. Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery, 4<sup>th</sup> Ed, Wiley-Blackwell, 880 p., 2018.

PLATELL, C.; COOPER, D.; PAPADIMITRIOU, J. M.; HALL, J. C. The omentum, **World Journal of Gastroenterology**, v. 6, n. 2, p. 169 – 176, 2000.

PREVEL, C. D.; EPPLEY, B. L.; SUMMERLIN, D. J.; SIDNER R.; JACKSON J. R.; McCARTY, M.; BADYLAK, S. F. Small intestinal submucosa: utilization as a wound dressing in full-thickness rodent wounds. **Annals of Plastic Surgery**, v. 35, n. 4, p. 381 – 388, 1995.

RANVIER I. Du développement et de l'accroissement des vaisseaux sanguins. **Arch Physiol Norm Path**. n. 6, p. 429 – 449, 1874.

ROA, D. M.; BRIGHT, R. M.; DANIEL, G. B.; McENTEE, M. F.; SACKMAN, J. E.; MOYERS, T. D. Microvascular transplantation of a free omental graft to the distal extremity in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 28, p. 456-465, 1999.

ROSS, W. E.; PARDO, A. D. Evaluation of an omental pedicle extension technique in the dog. **Veterinary Surgery**, v. 22, n. 1, p. 37-43, 1993.

SAI, K. P.; REDDY, P. N.; BABU, M. Investigations on wound healing by using amphibian skin. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 33, n. 9, p. 673 – 676, 1995.

SAIFZADEH, S.; HOBENAGHI, R.; ASADOLAH, A. Linear esophagotomy reinforcement with nonvascularized omental autograft (NOA), **Journal of Investigative Surgery**, v. 22, n. 3, p. 207 – 213, 2009a.

SAIFZADEH, S.; HOBENAGHI, R.; NAGHADEH, B. D.; POURREZA, B.; KAZEMI, S. Autogenous greater omentum, as a free nonvascularized graft, enhances bone healing: an experimental nonunion model. **Journal of Investigative Surgery**, v. 22, n. 2, p. 129 – 137, 2009b.

SAITO, C. T. M. H.; BARNABÉ, P. F. E.; OKAMOTO, R.; OKAMOTO, T. Reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos aos fios de sutura poliglicaprone 25 (monocryl) e poliglactina 910 (vicryl). **Salusvita**, v. 26, n. 2, p. 27-38, 2006.

SCHÄFFER, M.; WITTE, M.; BECKER, H. D. Models to study ischemia in chronic wounds. **The International Journal Lower Extremity Wounds**, v. 1, n. 2, p. 104-111, 2002.

SCHÄFFER, M.; WERNER S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacological Research**, v. 58, n. 2, p. 165 – 171, 2008.

SCOTT, P. G.; GHAHARY, A.; TREDGET, E. E. Molecular and cellular aspects of fibrosis following thermal injury, **Hand Clinics**, v. 16, n. 2, p. 271 – 287, 2000.



SHAH, S.; LOWERY, E.; BRAUN, R. K.; MARTIN, A.; HUANG, N.; MEDINA, M.; SETHUPATHI, P.; SEKI, Y.; TAKAMI, M.; BYRNE, K.; WIGFIELD, C.; LOVE, R. B.; IWASHIMA, M. Cellular basis of tissue regeneration by omentum. **PLoS One**, v. 7, n. 6, 10.1371/journal.pone.0038368, 2012.

SHEN, Y. M.; SHEN, Z. Y. Greater omentum in reconstruction of refractory wounds, **Chinese Journal of Traumatology**, v. 6, n. 2, p. 81 – 85, 2003.

SILVA, M. F. A. Cicatrização. In: OLIVEIRA, A. L. A. Técnicas Cirúrgicas em Pequenos Animais. 1ª Ed. Elsevier, p. 47-56, 2012.

SINGER, A. J.; CLARK, A. F. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 738 – 746, 1999.

SINGH, A. K.; PATEL, J.; LITBARG, N. O.; GUDEHITHLU, K. P.; SETHUPATHI, P.; ARRUDA, J. A. L.; DUNEA, G. Stromal cells cultured from omentum express pluripotent markers, produce high amounts of VEGF, and engraft to injured sites. **Cell and Tissue Research**, v. 332, n. 1, p. 81 – 88, 2008.

SONG, D. The greater omentum: its use in the surgical management of severely infected leg soft tissue and bone injuries. Report of two cases. **The Central African Journal of Medicine**, v. 35, n. 6, p. 423 – 425, 1989.

SOUZA, B. R.; CARDOSO, J. F.; AMADEU, T. P.; DESMOULIÈRE, A.; COSTA, A. M. A.; Sympathetic denervation alters wound contraction and granulation tissue formation in cutaneous wound healing. **Wound Repair and Regeneration**. v. 13, p. 498-505, 2005.

SOUZA, M. V.; PINTO, J. O.; COSTA, M. B. M.; ALVES, M. S.; SILVA, M. O.; MARTINHO, K. O.; FIETTO, L. G. Expressão gênica de colágeno em ferida cutânea de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 233 – 240, 2014.

STRAYER, D. S.; RUBIN, E. Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine, 7<sup>th</sup> Ed, Lippincott Williams & Wilkins, 1616p, 2015.

SUVIK, A.; EFFENDY, A. W. M. The use of modified Masson's Trichrome Staining in collagen evaluation in wound healing study. **Malaysian Journal of Veterinary Research**, v. 3, n. 1, p. 39 – 47, 2012.

TEIXEIRA, J. G. C. Enxerto Omental Livre sem Anastomose na Cicatrização de Feridas em Gatos (*Felis catus*), Dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 42 p. 2018.

THEORET, C. Physiology of Wound Healing. In: STASHAK, T. S.; THEORET, C. Equine Wound Management, 2 Ed, Wiley-Blackwell, p. 1 – 13, 2008.

THOMPSON, S. A.; POLLOCK, B. The use of free omental grafts in the thorax. An experimental study. **The American Journal of Surgery**, v. 70, n. 2, p. 227 – 231, 1945.

TRIVEDI, G.; GUPTA, M. Evaluation of isolated omental graft – homologous & autologous: an experimental study. **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences**, v. 2, n. 48, p. 9371 – 9375, 2013.

VINEBERG, A.; PIFARRE, R.; MERCIER, C. An Operation Designed to Promote the Growth of New Coronary Arteries, Using a Detached Omental Graft: A Preliminary Report. **Canadian Medical Association Journal**, v. 86, n. 24, p. 1116 – 1118, 1962.

WALGENBACH, K. J.; GRATAS, C.; SHESTAK, K. C.; BECKER, D. Ischaemia-induced expression of bFGF in normal skeletal muscle: A potential paracrine mechanism for mediating angiogenesis in ischaemic skeletal muscle. **Nature Medicine**, v. 1, p. 453 – 459, 1995.

WERNER, S., GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 3, p. 835 – 870, 2003.

WERNER, S., KRIEG, T.; SMOLA, H. Keratinocyte–fibroblast interactions in wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 127, n. 5, p. 998–1008, 2007.

WILKOSZ, S.; IRELAND, G.; KHWAJA, N.; WALKER, M.; BUTT, R.; DE GIORGIO-MILLER, A.; HERRICK, S. E. A comparative study of the structure of human and murine greater omentum, **Anatomy and Embryology**, v. 209, n. 3, p. 251 – 261, 2005.

ZHANG, Q. X.; MAGOVERN, C. J.; MACK, C. A.; BUDENBENDER, K. T.; KO, W.; ROSENGART, T. K. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. **Journal of Surgical Research**, v. 67, n. 2, p. 147 – 154, 1997.

## ANEXOS

### A Certificado de aprovação da Comissão de ética no Uso de Animais



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ENXERTO OSMENTAL LIVRE SEM ANASTOMOSE VASCULAR NA DICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM RATOS", protocolada sob a CEUA nº 1784040313 (já aceita), sob a responsabilidade de **Marta Fernanda Albuquerque da Silva** e equipe: **Marcelo de Oliveira Henriques; Carla Myrrha Chaves Dugue Henriques** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o Homem), para fins de pesquisas científicas ou ensino - está de acordo com as preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.099 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 10/05/2018.

We certify that the proposal "FREE OSMENTAL GRAFT WITHOUTH VASCULAR ANASTOMOSIS ON SKIN HEALING IN RATS", utilizing 32 Heterogenica rats (32 males), protocol number CEUA 1784040313 (já aceita), under the responsibility of **Marta Fernanda Albuquerque da Silva** and team: **Marcelo de Oliveira Henriques; Carla Myrrha Chaves Dugue Henriques** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6099 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 05/10/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de 05/2018 a 05/2018

Área: **Medicina e Cirurgia Veterinária**

Origem: **Animais provenientes de outros projetos**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **80 a 100 dias**

Nº: **32**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **250 a 280 g**

Local de experimento: **Instituto de Biologia do Exato, na sua biotério da Divisão de Veterinária.**

Scravópica, 18 de junho de 2018

Prof. Dr. Fabio Barbosa Scott

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Janimar Ferreira Paiva

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

## B Histopatologia

<b>LÂMINAS H.E</b>	<b>Infiltrado neutrofilico</b>	<b>Infiltrado Mononuclear</b>	<b>NEOVASCULARIZAÇÃO</b>	<b>EDEMA</b>	<b>NECROSE</b>	<b>FIBROSE</b>	<b>OUTRAS OBSERVAÇÕES</b>
OMENTO 7 DIAS (1)	3	2	1	0	3	2	Formação de crostas com presença de colônia bacteriana secundária
OMENTO 7 DIAS (2)	4	0	2	0	3	3	Formação de crostas, foco discreto de hemorragia
OMENTO 7 DIAS (3)	2	2	1	0	4	4	Formação de crostas com presença de colônia bacteriana secundária e congestão leve
OMENTO 7 DIAS (4)	4	3	2	1	4	4	Formação de crostas com focos de hemorragia e colônia bacteriana secundária, focos aleatórios de mineralização
OMENTO 7 DIAS (5)	3	0	2	0	2	3	-
OMENTO 7 DIAS (6)	3	0	0	0	4	3	Formação de crostas com área de hemorragia moderada, presença de colônia bacteriana secundária, focos de mineralização discretos e aleatórios
OMENTO 7 DIAS (7)	3	0	0	0	3	3	Formação de crostas
CONTROLE 7 DIAS (1)	3	3	1	0	3	3	-
CONTROLE 7 DIAS (2)	3	0	1	0	3	3	Área de hemorragia
CONTROLE 7 DIAS (3)	1	2	0	0	1	2	Formação de crosta leve
CONTROLE 7 DIAS (4)	3	1	1	0	4	3	Formação de crostas
CONTROLE 7 DIAS (5)	4	4	0	0	4	4	Formação de crostas com área focalmente extensiva de hemorragia
CONTROLE 7 DIAS (6)	3	2	1	0	3	3	Formação de crostas como focos de hemorragia
CONTROLE 7 DIAS (7)	4	0	1	0	4	4	Formação de crostas

<b>LÂMINAS H.E</b>	<b>Infiltrado neutrofilico</b>	<b>Infiltrado Mononuclear</b>	<b>NEOVASCULA RIZAÇÃO</b>	<b>EDEMA</b>	<b>NECROSE</b>	<b>FIBROSE</b>	<b>OUTRAS OBSERVAÇÕES</b>
OMENTO 14 DIAS (1)	2	0	0	0	0	2	Área de ulceração
OMENTO 14 DIAS (2)	0	1	0	0	0	1	-
OMENTO 14 DIAS (3)	0	3	0	0	0	2	Área focal crostosa
OMENTO 14 DIAS (4)	3	3	3	2	0	3	Área crostosa com foco de hemorragia discreto
OMENTO 14 DIAS (5)	3	3	0	2	3	2	Formação de crostas
OMENTO 14 DIAS (6)	0	3	2	3	2	3	-
OMENTO 14 DIAS (7)	3	3	2	2	3	3	Formação de crostas com focos de hemorragia discretos
CONTROLE 14 DIAS (1)	0	0	0	0	0	2	-
CONTROLE 14 DIAS (2)	0	0	0	0	0	1	-
CONTROLE 14 DIAS (3)	0	2	0	1	0	2	-
CONTROLE 14 DIAS (4)	0	1	0	0	0	2	Formação de crostas
CONTROLE 14 DIAS (5)	0	1	1	0	0	2	Formação de crostas
CONTROLE 14 DIAS (6)	2	2	0	0	2	2	Formação de crostas com foco de hemorragia
CONTROLE 14 DIAS (7)	Média	0	2	0	2	3g	Formação com crosta com focos de hemorragia

### C Análises Clínicas e Macroscopia

Grupo	Animal	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 10	Dia 14
OM7	1	Omento projetando além da lesão, sg além das margens	Crosta vermelho escuro	Crosta vermelho escuro		
	2	Omento projetando além da lesão, sg além das margens	Crosta vermelha; entorno da margem amarelado brilhante	Crosta vermelho escuro, entorno ++		
	3	sg além das margens	Crosta amarelada com pequeno avanço sobre; parte da margem; Aumento de volume no SC	Crosta vermelho escuro; Abscesso sob a crosta		
	4	sg além das margens	Crosta vermelho escuro; crosta hemorrágica no entorno +++++	Crosta vermelho escuro; crosta hemorrágica no entorno +++++; maravalha aderida		
	5	sg além das margens	Crosta vermelho escuro; crosta entorno +; margem indefinida	Crosta vermelho escuro; crosta entorno +;		
	6	(-)	Crosta vermelha com pontos escuros; crosta escura no entorno ++			
	7	(-)	Crosta vermelho escuro	Crosta vermelho escuro; crosta escura no entorno +; margem indefinida		
CT7	1	(-)	Crosta vermelho escuro; entorno hiperemia leve	Crosta vermelho escuro		
	2	(-)	Crosta vermelho escuro periférica; centro da lesão acinzentado; crosta entorno ++	Crosta vermelho escuro, mais intenso na periferia; Crosta vermelho escuro+		
	3	(-)	Crosta vermelha;	Crosta vermelho		

			maravalha aderida	escura; maravalha aderida		
	4	(-)	Crosta vermelho escuro	Crosta vermelho escuro; crosta entorno+		
	5	(-)	Superfície vermelho claro, úmida, brilhante	Crosta vermelho enegrecida; crosta entorno +++; mensuração difícil		
	6	(-)	Crosta vermelha	Crosta vermelha escuro		
	7	(-)	Crosta parcial vermelha; Secreção hemorrágica; crosta entorno +++++	Crosta vermelha escuro; crosta entorno +++++		

Grupo	Animal	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 10	Dia 14
OM14	1	(-)	Crosta vermelha	Crosta vermelho escuro; bordas indefinidas	Hemorragia – mensuração difícil.	(-)
	2	sg além das margens	Crosta vermelha; crosta entorno ++ clara e brilhante	Crosta vermelha; crosta entorno ++ clara	crosta entorno ++	(-)
	3	Omento projetando além da lesão, sg além das margens	Crosta vermelho claro; Bordas indefinidas;	Crosta amarelada; bordas indefinidas	Bordas indefinidas	Maravalha aderida
	4	sg além das margens	Crosta vermelho escuro; Secreção purulenta; aumento de volume no SC; crosta entorno +++	Crosta vermelho escuro; aumento de volume no SC; secreção	Abscesso no SC e secreção, aumento de volume, crosta hemorrágica	Secreção purulenta e aumento de volume.  Entorno da ferida +
	5	Omento projetando além da lesão	Crosta amarelada; crosta entorno +	Crosta amarelada; crosta entorno +	crosta entorno +	Entorno da ferida ++
	6	sg além das margens	Crosta vermelha; crosta entorno +	Crosta vermelha; crosta entorno ++; ferimentos distantes da lesão	crosta entorno +	Ferimento distante da lesão. Crosta normal
	7	sg além das margens	Superfície vermelho claro, úmida, brilhante	Crosta vermelha; crosta entorno +; pequeno	crosta entorno +, vermelho escura	Entorno da ferida ++



				ferimento próximo à lesão	brilhante	
CT14	1	(-)	Crosta vermelha; crosta entorno +	Crosta vermelha; crosta entorno +++; margem indefinida	crosta entorno +	(-)
	2	(-)	Crosta vermelho escuro	Crosta vermelho escuro	crosta entorno +	crosta entorno +
	3	(-)	Crosta vermelho escuro; secreção sanguinolenta sob a crosta; crosta no entorno +++, mensuração difícil; desconsiderar?	Crosta amarelo acinzentado, aspecto purulento; crosta entorno +	crosta entorno +	(-)
	4	(-)	Crosta vermelha	Crosta vermelho escuro	Secreção purulenta; bordas indefinidas	crosta entorno ++
	5	(-)	Crosta vermelho claro; Secreção sero-sanguinolenta; crosta entorno ++ – mensuração difícil;	Crosta vermelho escuro; entorno com ferimentos; crosta no entorno ++	Entorno com ferimentos	Entorno com ferimentos
	6	(-)	Crosta vermelho escuro; crosta entorno +	Crosta vermelho acinzentado	crosta entorno +	crosta entorno +
	7	(-)	Crosta vermelho escuro	Crosta vermelho escuro	crosta entorno +	crosta entorno +

Não houve perda do omento nos animais dos grupos tratados;  
Nenhuma complicação da obtenção do fragmento do omento (celiotomia);  
Formação de abscesso em 02 animais tratados (OM 7 Nr 3 - OM14 Nr 4);  
Secreção purulenta em 03 animais (CT14 Nr 3 – CT14 Nr 4 – OM14 Nr 4).