

Avaliação microscópica e ultra-estrutural do endotélio de veia safena preparada pela técnica “no touch”

Microscopic and ultrastructural evaluation of the saphenous vein endothelium for CABG prepared by the no touch technique

Virgílio Figueiredo SILVA¹, Márcia Marcelino de Souza ISHIGAI², Edna FREYMÜLLER³, João Nelson Rodrigues BRANCO⁴, Diego Felipe GAIA⁵, Edmo Atique GABRIEL⁶, Renata Aparecida Leonel ROMÃO¹, Enio BUFFOLO⁷

RBCCV 44205-995

Resumo

Objetivo: O enxerto de veia safena (VS) utilizado em revascularização miocárdica possui uma vida útil, sendo o estágio final a oclusão do vaso. Esforços em adquirir novas técnicas de coleta da VS podem possibilitar uma viabilidade maior do enxerto.

Métodos: Vinte pacientes foram randomizados e divididos em dois grupos com o objetivo de avaliação do endotélio vascular. A técnica “no touch” (NT) consiste em retirar o segmento de VS com o tecido perivascular. A técnica convencional consiste em retirar a VS, com remoção “in situ” do tecido perivascular e conseqüente vasoespasmo. Houve um padrão de retirada das VS com incisões longitudinais escalonadas. Características da VS foram consideradas. A avaliação do endotélio das VS foi realizada usando microscópio eletrônico (ME) pelo método de varredura e de transmissão. Cortes histológicos das VS foram corados em Hematoxilina-Eosina (HE). O colágeno subendotelial foi analisado pelos métodos de Picro-Sírius e Tricrômio de Masson.

Resultados: A ME evidenciou que o Grupo NT possui maiores áreas endoteliais não desnudadas, além de um

menor número de células degradadas. A coloração em HE nos permitiu verificar a forma e a integridade das camadas das VS. Há um predomínio maior de fibras colágenas coradas no Grupo NT.

Conclusões: A técnica NT permite uma melhor preservação endotelial da VS, sugerindo um enxerto mais viável em longo prazo.

Descritores: Veia safena. Revascularização miocárdica. Endotélio vascular. Ponte de artéria coronária.

Abstract

Objective: Saphenous vein grafts (SV) used in coronary artery bypass grafting have a limited life and vein occlusion may be the final adverse effect. Efforts to develop new techniques to harvest the saphenous vein may improve the viability of the graft.

Methods: Twenty patients were randomly divided into two groups with the objective of evaluating the vascular endothelium. The No Touch (NT) technique consists in

1. Graduação em medicina da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina
2. Doutora em medicina; Médica contratada do Departamento de Patologia Investigativa da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.
3. Livre Docente; Chefe do Setor de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.
4. Livre Docente; Professor adjunto e Chefe do setor de Transplante Cardíaco da Disciplina de Cirurgia Cardiovascular da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.
5. Mestre em medicina; Médico da Disciplina de Cirurgia Cardiovascular da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.
6. Doutora em medicina; Médico da Disciplina de Cirurgia Cardiovascular da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.
7. Livre Docente; Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Cardiovascular da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

Trabalho realizado nas disciplinas de Cirurgia Cardiovascular e Patologia Investigativa, Centro de Microscopia Eletrônica, Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, Brasil.

Endereço para correspondência:

Virgílio Figueiredo Silva. Avenida Onze de Junho, 911 ap 210 - São Paulo, SP, Brasil. CEP 04041-053.

E-mail: virepm71@yahoo.com.br

Apoio: CNPq, IPECICAR (Instituto de Pesquisa em Cirurgia Cardíaca da UNIFESP - EPM).

Artigo recebido em 25 de novembro de 2007

Artigo aprovado em 18 de agosto de 2008

removing the saphenous vein with perivascular tissue. The conventional technique consists in harvesting with "in situ" removal of the perivascular tissue. The standard saphenous vein harvesting procedure used bridged incisions. Characteristics of the vein were considered. Evaluation of the endothelium was achieved by electron microscopy and histologic analysis using hematoxylin eosin staining. The Picrosirius and Masson Trichrome methods were used to analyze subendothelial collagen.

Results: Electron microscopy demonstrated that the NT Group had larger non-denudated endothelial areas as well

as a smaller number of degraded cells. Histological analysis showed the form and integrity of the saphenous vein layers. A larger amount of collagen fibers were identified in the NT Group.

Conclusions: The NT technique better preserves the saphenous vein endothelium suggesting a more viable graft in the long term.

Descriptors: Saphenous vein. Myocardial revascularization. Endothelium, vascular. Coronary artery bypass.

INTRODUÇÃO

A doença coronariana aterosclerótica é a causa mais importante de morbidade e mortalidade em nações industrializadas. Em todo o mundo, mais de um milhão de pessoas morrem anualmente da doença arterial coronariana [1].

A revascularização miocárdica é uma das mais freqüentes operações realizadas em todo o mundo, sendo que, nas últimas três décadas, desde a realização da primeira revascularização direta do miocárdio, muitos avanços aconteceram, relacionados, sobretudo, à revisão de vários conceitos concernentes a aterosclerose, tecnologia e técnica cirúrgica.

Um dos elementos chaves do sucesso em longo prazo na cirurgia de revascularização miocárdica é a escolha do enxerto ideal. Análises, tais como do estado nativo das artérias coronarianas, das co-morbidades, da apresentação clínica e da possibilidade de competição de fluxo são importantes na escolha do enxerto a ser utilizado. Os condutos mais usados são a artéria torácica interna esquerda (ATIE) (mamária); artéria torácica interna direita (ATID); artéria radial (AR); artéria gastroepiplóica (AG); artéria epigástrica inferior (AEI) e veia safena magna (VS) [2].

O uso da veia safena (VS) como enxerto coronariano, introduzido na década de 1960, alterou profundamente a situação de pacientes com doença isquêmica do coração, trazendo para esses uma melhor qualidade de vida e aumentando a sobrevida dos mesmos. Entretanto, a perviedade limitada dos enxertos utilizando veia safena está associada à recorrência de angina [3], além de ser uma das principais causas de reoperação.

Tem sido demonstrado que aproximadamente 30% dos enxertos por uso de VS ocluem dentro do primeiro ano de pós-operatório e em 10 anos a taxa de oclusão pode ser maior que 50% [4].

A utilização de enxertos arteriais tem mostrado resultados superiores em termos de perviedade a longo prazo, principalmente quando nos referimos à artéria torácica

interna esquerda utilizada na revascularização da artéria interventricular anterior. Apesar disso, o uso da VS continua a ser largamente utilizado em revascularização do miocárdio, já que o número de enxertos arteriais adequados disponíveis é limitado, restringindo uma revascularização arterial completa.

Dentro desta perspectiva, torna-se essencial a pesquisa de métodos capazes de otimizar os resultados obtidos com os enxertos atualmente utilizados, em especial a VS. A metodologia de preparo da veia possui importante papel e seu modo de dissecação pode influenciar significativamente no resultado obtido, na medida que trauma mecânico pode comprometer a integridade endotelial com conseqüentes danos morfo-funcionais [5].

Convencionalmente, durante a retirada da VS, o tecido perivascular é removido da veia com conseqüente vasoespasmó, o qual é superado pela distensão mecânica intencional da veia. Estes procedimentos resultam em significativa denudação da superfície endotelial [6].

Recentemente, uma nova técnica cirúrgica tem sido descrita na qual a veia safena é retirada junto com o tecido perivascular através de mínima manipulação do vaso [7]. Esta técnica denominada "no touch" evita o vasoespasmó, além de eliminar a necessidade de distensão da veia. Quando comparada à técnica convencional, esta técnica mostrou um aumento significante na funcionalidade vascular do enxerto venoso em longo prazo [8].

O presente estudo se propôs, por meio de estudos histológicos e ultra-estruturais, a reforçar as evidências de que a chamada técnica "no touch" de retirada de VS humanas é superior aos métodos tradicionais.

MÉTODOS

Após o projeto ter sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, com nº de protocolo 0984/05, os pacientes foram randomizados em dois grupos. Vinte pacientes foram incluídos em nosso estudo, divididos em grupo convencional e "no touch", sendo que cada grupo

possui 10 pacientes. O processo de seleção dos pacientes teve como objetivo a possibilidade de seguimento em longo prazo. Como critérios de exclusão para o estudo, propusemos: pacientes portadores de doença isquêmica que seriam submetidos a cirurgia de revascularização miocárdica sem o uso de circulação extracorpórea e que apresentassem outras doenças, como neoplasias, imunodeficiências e outras que pudessem alterar o padrão hemodinâmico do paciente e mascarar os resultados.

Técnica de preparação da veia

Após revisão bibliográfica da literatura, propusemos uma técnica cirúrgica de coleta de veia, denominada “no touch”, para enxerto coronariano que minimamente agredisse a veia.

Grupos de estudo

Grupo “No Touch”

A técnica denominada “no touch” consiste na retirada do segmento de veia safena magna da perna com o tecido perivascular. Isso permite que não haja manuseio da região intimal e ao redor da VS e que os possíveis fatores moleculares produzidos por aquele tecido fossem preservados (Figura 1).



Fig. 1 - Foto cirúrgica de um segmento de VS “no touch”

Grupo convencional

A técnica convencional consiste na retirada da VS “in situ”, na qual o tecido perivascular é removido com conseqüente vasoespasmo, o qual é superado pela distensão mecânica intencional da veia. Estes procedimentos resultam em significativa denudação da superfície endotelial (Figura 2).

Em todos os pacientes, houve um padrão de retirada das VS com incisões longitudinais escalonadas, o que torna a cirurgia mais estética e diminui os riscos de infecção local.



Fig. 2 - Foto cirúrgica de um segmento de VS convencional

Técnica cirúrgica

Cardioplegia anterógrada (4°C) através do óstio coronariano com circulação extracorpórea e moderada hipotermia (28°C a 30°C) foram rotineiramente utilizadas. Para evitar sangramento das anastomoses, vasos colaterais das veias foram ligados com fios de algodão 4.0. As anastomoses distais foram inicialmente realizadas e os segmentos proximais posteriormente ligados na aorta. A artéria torácica interna foi utilizada como ponte para artéria interventricular anterior. Características da veia, como qualidade e origem, foram consideradas.

Avaliação ultra-estrutural

Análise morfológica do endotélio das veias foi realizada usando microscópio eletrônico. Para tanto, se procedeu à coleta de um segmento proximal de 0,5 cm que foi fixado em reagente apropriado. O segmento foi imerso em um frasco com solução de glutaraldeído a 2,5% e acondicionado em caixa térmica resfriada a 4°C. O conjunto foi levado ao setor de microscopia eletrônica da UNIFESP-EPM. No local, o segmento foi preparado por técnico especializado e lido em microscopia de varredura, que permite visibilizar a superfície endotelial, e também em microscopia de imersão, que permite visibilizar limites e conteúdos celulares.

Avaliação microscópica

Outros dois segmentos da VS (proximal e distal) de 0,5 cm foram coletados e imersos em frasco com formol a 10%. Os dois conjuntos foram levados ao Setor de pesquisas do Departamento de Patologia da UNIFESP-EPM e protocolados. As veias foram seccionadas transversalmente e incluídas em blocos de parafina. Realizado o bloco de parafina, o conjunto foi cortado em micrótomo e lâminas foram preparadas para coloração em Hematoxilina-Eosina (HE), Tricromio de Masson e Picro-Sirius.

De cada bloco de parafina, foram preparadas três lâminas, uma com cada reagente descrito.

O reagente HE permite uma visualização microscópica das estruturas gerais da VS, evidenciando as camadas vasculares e possíveis depósitos celulares. Tanto o reagente Picro-Sirius como Tricromio de Masson são utilizados para corar o colágeno subendotelial.

As lâminas foram lidas por patologista que não tinha conhecimento a que grupo a veia pertencia.

Plano piloto

Para uma otimização da coleta, técnica cirúrgica e preparo das lâminas, elaborou-se um plano piloto. Foram coletadas dez veias, preparadas como descrito anteriormente. Esse material nos permitiu testar os reagentes, otimizando o uso dos mesmos e assimilar erros durante a coleta e o preparo do material, o que permitiu informar aos cirurgiões um melhor meio retirar os segmentos.

RESULTADOS

A análise por microscópio eletrônico das peças cirúrgicas evidenciou que o Grupo “no touch” possui maiores áreas endoteliais não desnudadas, além de um menor número de células degradadas pelo processo de manipulação (Figuras 3 a 6).



Fig. 3 - Foto de microscopia de imersão, demonstrando uma célula endotelial preservada (E)

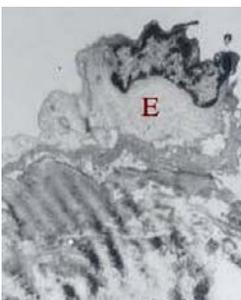


Fig. 4 - Foto de microscopia de imersão, demonstrando uma célula endotelial danificada (E)



Fig. 5 - Foto de microscopia de varredura, demonstrando área com células endoteliais preservadas. Célula endotelial (E)



Fig. 6 - Foto de microscopia de varredura, demonstrando área desnuda de células endoteliais. Célula endotelial isolada (E)

A coloração em HE permitiu verificar a presença de todas as camadas das VS. Isso é importante, pois exclui fatores relacionados a trauma ou possíveis reações com o reagente de preservação que pudessem interferir com as camadas vasculares, além de nos dar uma visão do aspecto das veias. O grupo convencional é caracterizado por um lúmen mais estreito e por aspecto mais agredido da camada íntima, provavelmente pela manipulação manual da amostra (Figuras 7 e 8).

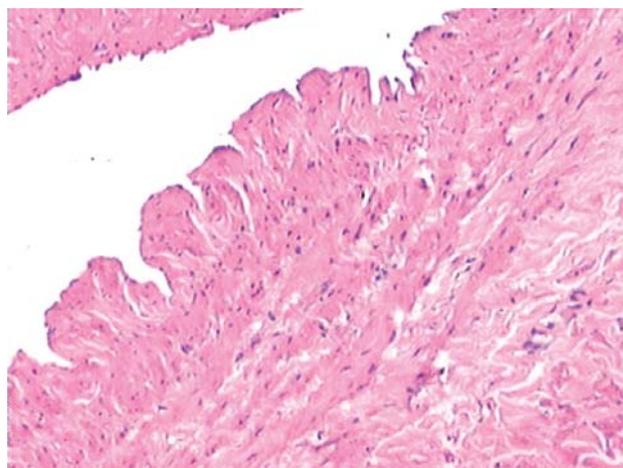


Fig. 7 - Corte transversal de veia safena convencional corada por HE. Note a luz em fenda característica do vasoespasma venoso devido à distensão pressórica

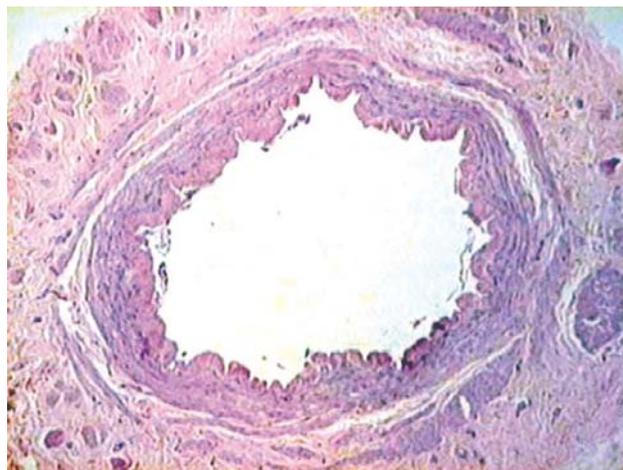


Fig. 8 - Corte transversal de veia safena “no touch” corada por HE. Observa-se o formato ovalado da luz e a continuidade da camada íntima

A observação das lâminas preparadas para avaliar o colágeno subendotelial nos permite inferir que há um predomínio maior de fibras coradas pelo grupo “no touch”. Isso demonstra que há menor degradação das VS quando

essas não são manipuladas e distendidas com altas pressões. As fotografias das lâminas permitem uma visualização de áreas mais homogêneas no Grupo “no touch”, o que é um fator de preservação endotelial (Figuras 9 e 10).

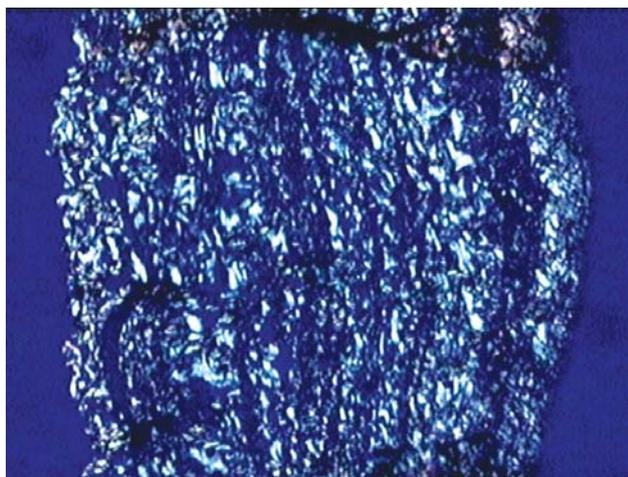


Fig. 9 - Corte longitudinal de uma VS convencional corado por método de Tricromio de Masson e observado em contracoloração

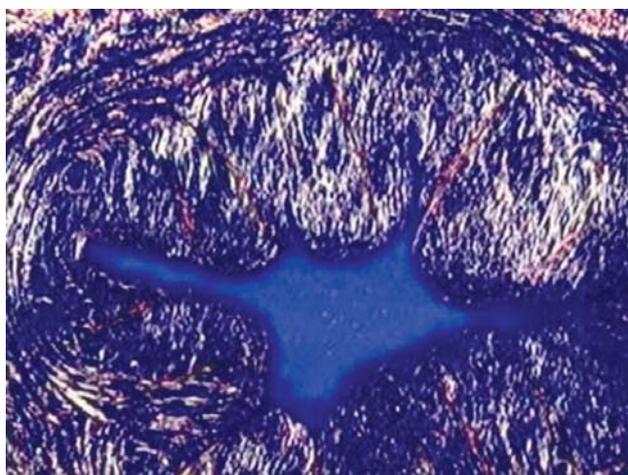


Fig. 10 - Corte transversal de uma VS “no touch” corado por método de Tricromio de Masson e observado em contracoloração. Há maior brilho emitido pela coloração nesta foto em relação à anterior, o que demonstra um maior número de fibras colágenas coradas e preservadas

DISCUSSÃO

As células endoteliais formam uma monocamada que reveste todo o sistema vascular. Sua integridade estrutural e funcional constitui um requisito fundamental para a manutenção da homeostasia da parede do vaso e da função

circulatória. O endotélio vascular é um tecido multifuncional com propriedades sintéticas e metabólicas, como a manutenção da barreira de permeabilidade do vaso; elaboração de moléculas anticoagulantes e antitrombóticas; elaboração de moléculas pró-trombóticas; produção de matriz extracelular; modulação do fluxo sanguíneo e da reativação celular; regulação da inflamação, imunidade e crescimento celular [9].

O procedimento para implante de “bypass” (derivação) em artéria coronária é um procedimento cirúrgico crescente. As derivações são realizadas utilizando-se mais frequentemente os enxertos de VS e ATI. Diferentes propriedades funcionais e estruturais entre artérias e veias podem explicar os melhores resultados das pontes arteriais [10]. Entretanto, algo merece destaque: o endotélio da ATI é protegido durante toda a preparação para o uso e em 90% dos pacientes o enxerto permanece desobstruído dentro de 10 anos [11]. Por outro lado, o enxerto de VS não é, como dito, protegido pela técnica convencional de preparação da veia, o que pode levar a importante lesão endotelial [12].

Proliferações da musculatura lisa da túnica média são similares na VS e na ATI [13]. Entretanto, proliferações se tornam mais acentuadas em veias que sofrem lesão endotelial durante a preparação. Isto demonstra que a grande causa de hiperplasia da camada íntima, detectada nos enxertos venosos, pode não se justificar apenas pelas diferenças intrínsecas entre artérias e veias, mas pela grande sensibilidade da veia ao trauma.

Muitas estratégias têm sido utilizadas para prevenir a oclusão das veias. Adventos oriundos das novas terapias com agentes farmacológicas [14] e a terapia gênica [15] estão sendo cada vez mais valorizados. Entretanto, é necessário que surjam melhores técnicas cirúrgicas para prevenir lesões da parede venosa durante a operação.

A técnica “no touch” (NT) de retirada veia safena, na qual a veia é retirada com o pedículo de tecido perivascular, é uma das técnicas que surgiram para contornar o problema [7]. Estudos prospectivos com esta técnica demonstraram que a integridade endotelial e a atividade da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) foram melhor mantidas com o uso da técnica NT no preparo da veia safena [16,17].

O óxido nítrico (NO) é um potente vasodilatador que é sintetizado a partir da L-arginina pela NOS [18]. Outra propriedade do NO é a capacidade de inibir a ativação e a agregação plaquetária, adesão leucocitária e proliferação das células musculares lisas. No sistema cardiovascular, a NOS é expressa pelas células endoteliais, células musculares lisas, células, nervos perivasculars e plaquetas [19].

A atividade vasodilatadora e bloqueadora da agregação plaquetária causada pelo NO é responsável pela proteção da veia contra o espasmo, como também pela alta perviedade imediata da mesma. Além disso, as propriedades mecânicas

providas pelo tecido gorduroso em volta da veia podem contribuir para o melhor resultado desta nova técnica [17,20].

Por meio das técnicas morfológicas e de coloração descritas anteriormente, podemos observar uma diferença importante no padrão de conservação das veias quando elas são preparadas pelas técnicas descritas. A manipulação manual da amostra com distensão abusiva e sua lesão local com remoção da celularidade perivascular resulta em danos morfo-funcionais, com vasoespasmos venosos, o que favorece a trombose do vaso e sua oclusão.

A agressão endotelial observada pelas fotos de microscopia eletrônica impossibilita que haja a produção de fatores protetores locais como a NOS, além de possibilitar a produção de cininas que favorecem a vasoconstrição, em uma situação em que há um desbalanço entre os fatores enzimáticos.

A arquitetura celular foi mantida utilizando a técnica "no touch", o que se traduz por um conjunto de fibras colágenas não danificadas organizadas e dispostas ao redor do vaso, possibilitando a tensão adequada na parede vascular.

Embora nossos resultados demonstrem VS com características que sugerem melhor preservação das mesmas, quando estas são retiradas com seu leito vascular através da técnica "no touch", nossos resultados até o momento são caracterizados como observacionais. Não refletem valores numéricos da espessura intimal, proporção de células endoteliais por campo óptico, refrigência por pixel da expressão colágeno subendotelial. Para a resposta a estes questionamentos será necessária a avaliação morfométrica e imunohistoquímica em estudos ulteriores.

CONCLUSÃO

A integridade endotelial foi melhor observada usando a técnica "no touch". A não remoção do tecido perivascular, com menor manipulação pressórica e manual da VS, sugere que a mesma tenha sua estrutura preservada e que fatores hormonais locais sejam mantidos.

REFERÊNCIAS

1. Eisenberg MS. The problem of sudden cardiac death. In: Eisenberg MS, Hallstrom AP, eds. Sudden cardiac death in the community. New York: Praeger; 1984. p.2.
2. Lima RC, Kubrusly LF, Nery AC, Pinheiro BB, Brick AV, de Souza DS, et al. Diretrizes de cirurgia de revascularização miocárdica. Arq Bras Cardiol. 2004;82(supl. V):1-20.
3. Campeau L, Enjalbert M, Lespérance J, Vaislic C, Grondin CM, Bourassa MG. Atherosclerosis and late closure of aortocoronary saphenous vein grafts: sequential angiographic studies at 2 weeks, 1 year, 5 to 7 years, and 10 to 12 years after surgery. *Circulation*. 1983;68(3 Pt 2):III-7.
4. Izzat MB, West RR, Bryan AJ, Angelini GD. Coronary artery bypass surgery: current practice in the United Kingdom. *Br Heart J*. 1994;71(4):382-5.
5. Mills NL, Everson CT. Vein graft failure. *Curr Opin Cardiol*. 1995;10(6):562-8.
6. Dries D, Mohammad SF, Woodward SC, Nelson RM. The influence of harvesting technique on endothelial preservation in saphenous veins. *J Surg Res*. 1992;52(3):219-25.
7. Souza D. A new no-touch preparation technique. Technical notes. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996;30(1):41-4.
8. Souza DS, Bomfim V, Skoglund H, Dashwood MR, Borowiec JW, Bodin L et al. High early patency of saphenous vein graft for coronary artery bypass harvested with surrounding tissue. *Ann Thorac Surg*. 2001;71(3):797-800.
9. Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev*. 1990;70(2):427-51.
10. Cox JL, Chiasson DA, Gotlieb AI. Stranger in a strange land: the pathogenesis of saphenous vein graft stenosis with emphasis on structural and functional differences between veins and arteries. *Prog Cardiovasc Dis*. 1991;34(1):45-68.
11. Nwasokwa ON. Coronary artery bypass graft disease. *Ann Intern Med*. 1995;123(7):528-45.
12. Lehmann KH, von Segesser L, Müller-Glauser W, Siebenmann R, Schneider K, Lüscher TF, et al. Internal-mammary coronary artery grafts: is their superiority also due to a basically intact endothelium? *Thorac Cardiovasc Surg*. 1989;37(3):187-9.
13. Holt CM, Francis SE, Newby AC, Rogers S, Gadsdon PA, Taylor T, et al. Comparison of response to injury in organ culture of human saphenous vein and internal mammary artery. *Ann Thorac Surg*. 1993;55(6):1522-8.
14. Sogo N, Campanella C, Webb DJ, Megson IL. S-nitrosothiols cause prolonged, nitric oxide-mediated relaxation in human saphenous vein and internal mammary artery: therapeutic potential in bypass surgery. *Br J Pharmacol*. 2000;131(6):1236-44.
15. Shears LL 2nd, Kibbe MR, Murdock AD, Billiar TR, Lizonova A, Kovesdi I, et al. Efficient inhibition of intimal hyperplasia by adenovirus-mediated inducible nitric oxide synthase gene transfer to rats and pigs in vivo. *J Am Coll Surg*. 1998;187(3):295-306.
16. Souza DS, Christofferson RH, Bomfim V, Filbey D. "No-

-
- touch" technique using saphenous vein harvested with its surrounding tissue for coronary artery bypass grafting maintains an intact endothelium. *Scand Cardiovasc J.* 1999;33(6):323-9.
17. Tsui JC, Souza DS, Filbey D, Karlsson MG, Dashwood MR. Localization of nitric oxide synthase in saphenous vein grafts harvested with a novel "no-touch" technique: potential role of nitric oxide contribution to improved early graft patency rates. *J Vasc Surg.* 2002;35(2):356-62.
18. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):109-42.
19. Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 1999;43(3):509-20.
20. Souza DSR, Dashwood MR, Tonazi A, Johansson B, Buffolo E, Lima R, et al. Preparation of the saphenous vein for coronary artery bypass grafting: a new technique "no touch" that maintains the vein wall integral and provides high immediate patency. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2003;18(4):303-11.