



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ FACULDADE DE
MEDICINA DEPARTAMENTO
DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICO
CIRÚRGICAS**

MATHEUS DUARTE PIMENTEL

**EFEITO DA PRESSÃO DE DISTENSÃO E DA SOLUÇÃO DE PRESERVAÇÃO SOBRE A
ULTRAESTRUTURA DO ENDOTÉLIO DA VEIA SAFENA MAGNA**

**FORTALEZA
2020**

MATHEUS DUARTE PIMENTEL

**EFEITO DA PRESSAO DE DISTENSAO E DA SOLUCAO DE PRESERVACAO
SOBRE A ULTRAESTRUTURA DO ENDOTELIO DA VEIA SAFENA MAGNA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós- Graduação em
Ciências Médico-Cirúrgicas da
Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Ceará,
como parte dos requisitos para
obtenção do Grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Glauco Lobo Filho

**FORTALEZA
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P699e Pimentel, Matheus Duarte.

Efeito da pressao de distensao e da solucao de preservacao sobre a ultraestrutura do endotelio da veia safena magna / Matheus Duarte Pimentel. – 2020.
111 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós- Graduação em Cirurgia, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. José Glauco Lobo Filho.

Coorientação: Prof. Dr. Heraldo Guedis Lobo Filho.

1. Veia safena magna. 2. Cirurgia de Revascularização do Miocárdio. 3. Solução Salina. 4. Sangue Arterial. 5. Pressão de distensão. I. Título.

CDD 617

MATHEUS DUARTE PIMENTEL

EFEITO DA PRESSAO DE DISTENSAO E DA SOLUCAO DE PRESERVACAO
SOBRE A ULTRAESTRUTURA DO ENDOTELIO DA VEIA SAFENA MAGNA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Glauco Lobo Filho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Heraldo Guedis Lobo Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Francisco Vagnaldo Fachine Jamacaru
Universidade Federal do Ceará

Dedico este trabalho,

À minha mãe, SILVIA ANTONELLE LOPES DUARTE, pelo imensurável amor, e pela incansável dedicação para que pudesse desenvolver-me como cidadão, pesquisador e, principalmente, como ser humano. Se aqui estou, é por sua causa. Obrigado por tudo.

Ao meu pai, MARNUS ALEX PIMENTEL COUTINHO, pela constante motivação para que buscasse ir além dos limites que acreditei existirem, e pelo amor que nos é dado.

Dedico à minha irmã, ISADORA DUARTE PIMENTEL, pela paciência, pelo carinho e pelo amor fraterno. Ao meu irmão, THIAGO DE OLIVEIRA PIMENTEL, por ser fonte constante de alegria e amor a todos nós.

Às minhas avós, ARACY ALMEIDA PIMENTEL e ZÉLIA LOPES DUARTE, e à minha tia, MONIQUE ANEVILLE PIMENTEL LIMA, por todo amor e dedicação.

À MARIANA GRANJEIRO ALMEIDA, pelo carinho e amor dedicados a mim, pela compreensão com nossa rotina, por vezes tão complexa, e por ser minha companheira e confidente nesta caminhada.

Aos amigos, e irmãos que a vida me apresentou e que seguem sempre a meu lado. CAROLINE CLEOPHAS LOBO LEITE, RODRIGO DIAS CUSTÓDIO e JOABE SOARES TEIXEIRA, sem o apoio de vocês nada disto seria possível.

Às equipes de médicos, enfermeiros, e fisioterapeutas que, desde o início de meu percurso na Medicina, permitiram-me constante aprendizado neste caminho árduo a todos nós.

Aos pacientes, sempre alvos de nossos cuidados, e em cujo benefício este estudo foi idealizado e realizado.

Ao Professor Doutor JOSÉ GLAUCO LOBO FILHO, por personificar a figura do mestre, ao ser aquele que motiva, inspira e que, ao ser o melhor cirurgião que já vi nestas minhas curtas andanças, serve de constante exemplo a mim.

Ao Professor Doutor HERALDO GUEDIS LOBO FILHO, que ao trilhar a caminhada pessoal enquanto cirurgião, professor, mentor, e amigo, inspira não apenas a mim, mas a toda uma geração de médicos a serem melhores não apenas no aspecto técnico, mas também no sentido humano, com compaixão e competência em tudo que faz.

A todos os demais mestres e professores que, desde a minha tenra infância se fazem presentes, sempre contribuindo para que possa crescer, e compreender melhor os aspectos científicos, éticos e filosóficos que permeiam a vida.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação *Strictu Sensu* em Ciências Médico-cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará (UFC), nas figuras do Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos e do Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues (*in memoriam*) pelo apoio aos pesquisadores no desenvolvimento desta pesquisa e de tantas outras previamente, e pelo seu fundamental papel no crescimento da ciência em nível local, nacional e internacional.

Ao Prof. Dr. JOSÉ GLAUCO LOBO FILHO, Vice-Reitor da Universidade Federal do Ceará, Professor de Cirurgia Cardiovascular da Universidade Federal do Ceará, e meu orientador. Obrigado pela dedicação ao ensino médico, pelo exemplo de cuidado aos pacientes, por sempre acreditar no potencial deste seu discente, e pelo incessante apoio em todas as fases deste estudo.

Ao Prof. Dr. HERALDO GUEDIS LOBO FILHO, Professor de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, pela imensurável contribuição para minha formação como médico e como ser humano. Sua trajetória e força de espírito motivam a todos ao seu redor.

Ao Prof. Dr. EMÍLIO DE CASTRO MIGUEL, pelo apoio desde os primórdios deste estudo, fornecendo apoio técnico, científico e possibilitando que este trabalho se realizasse.

Ao mestre SERGIMAR KENNEDY DE PAIVA PINHEIRO, pela disponibilidade, pelo auxílio desde o início deste trabalho e pelas incontáveis horas dedicadas às análises que precisamos realizar.

À equipe de cirurgia cardiovascular com a qual tenho a honra de trabalhar desde o início do minha graduação e que formaram e seguem contribuindo imensamente para minha formação médica e pessoal. Cirurgiões Prof. Dr. JOSÉ GLAUCO LOBO FILHO, Dr. HERALDO GUEDIS LOBO FILHO e Dr. MARCO AURÉLIO BARROSO AGUIAR. Anestesistas Dr. HAMARILTON REIS SALES, Dr. GERALDO GONÇALVES DA SILVEIRA, Dr. JOÃO VICTOR LOPES DAMASCENO, Dra. GERMANA MENDES MEDEIROS DAMASCENO. Perfusionista GLADSON FERNANDES VIEIRA, enfermeiro MOIZÉS AGUIAR XIMENES, fisioterapeuta MARCELA DE PAULA CAVALCANTE. Secretária ANNA KARINE ROCHA GUIMARÃES CASTRO. Muito obrigado a todos.

A toda a equipe do CENTRO DE RECUPERAÇÃO CARDIOPULMONAR do Hospital São Raimundo pelo zelo com nossos pacientes, com constante dedicação a prestar o melhor cuidado possível àqueles de nós necessitam, e à fundamental parcela que todos têm

em minha formação e atuação profissionais.

Ao Dr. FRANCISCO VAGNALDO FECHINE, pela imensurável contribuição na realização das análises estatísticas deste estudo.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e MAGDA MARIA GOMES FONTENELE pelas importantes contribuições para efetivação deste estudo.

“Nada, absolutamente nada, resiste ao trabalho”.

Euryclides de Jesus Zerbini (1912-1993)

“A verdadeira sabedoria está em reconhecer a própria ignorância”

Sócrates (470-399 a.C.)

RESUMO

A veia safena magna (VSM) segue relevante no contexto da cirurgia de revascularização do miocárdio (CRM). Estudos que indicam perviedade limitada deste conduto em longo prazo fazem com que a busca por melhores resultados cirúrgicos para os enxertos venosos seja constante. O objetivo deste estudo foi avaliar, com uso de microscopia eletrônica de varredura (MEV), os efeitos do uso de diferentes soluções de preservação de enxertos, e de diferentes pressões de distensão intraluminal sobre a anatomia ultraestrutural e a integridade endotelial de segmentos de VSM na CRM. 42 segmentos de VSM obtidos de doze pacientes submetidos a CRM foram divididos em sete grupos. O grupo 1 (controle) foi constituído por segmentos de VSM que, logo após exérese cirúrgica foram imediatamente fixados em solução de preservação. Segmentos dos grupos 2 e 3 foram distendidos e preservados com sangue arterial autólogo heparinizado (SAH) (grupo 2) ou solução fisiológica a 0,9% (SF) (grupo 3) a uma pressão de 30 mmHg e em mantidos sob esta mesma pressão com solução de fixação. Segmentos dos grupos 4 e 5 foram distendidos a pressão constante de 100 mmHg com SAH (grupo 4) ou SF 0,9% (grupo 5). VSM dos grupos 6 e 7 foram distendidas a uma pressão constante de 300 mmHg com SAH (grupo 6) ou SF 0,9% (grupo 7). Enxertos venosos foram encaminhados para análise por MEV, e um escore foi utilizado para mensuração do grau de dano endotelial. Observou-se que segmentos de VSM preservados com SF apresentavam dano endotelial significativamente maior tanto em comparação ao grupo controle, quanto em comparação aos grupos distendidos com pressões de 30 mmHg e de 100 mmHg. Segmentos distendidos com pressão de 300 mmHg apresentaram alto grau de dano, com considerável perda e separação de células endoteliais, extensos focos de exposição da membrana basal, e numerosas fraturas da camada íntima, sem diferenças quanto à solução utilizada. Segmentos distendidos a 30 mmHg apresentaram diminuto dano endotelial, em comparação a segmentos distendidos com pressões superiores a esta. Em suma, conclui-se que o preparo da VSM com uso de solução salina e com pressões de distensão intraluminal acima de 30 mmHg são fatores relacionados a maior dano ao endotélio destes enxertos, o que poderia reduzir a perviedade destes após a CRM. Adicionalmente, o uso de solução de preservação sanguínea e de baixas pressões de distensão foram fatores de proteção ao endotélio.

Palavras-chave: Veia safena magna; Cirurgia de Revascularização do Miocárdio; Solução Salina; Sangue Arterial; Pressão de distensão.

ABSTRACT

The saphenous vein (SV) remains relevant in the context of myocardial revascularization (CABG) surgery. Studies that indicate limited long-term patency of this conduit imposes constant search for better surgical results. The objective of this study was to evaluate, using scanning electron microscopy (SEM), the effects of using different graft preservation solutions, and different intraluminal distention pressures on ultrastructural anatomy, and in endothelial integrity of SV segments in CABG. 42 segments of SV obtained from twelve patients undergoing CABG were divided into seven groups. Group 1 (control) consisted of SV segments that, after surgical excision, were immediately preserved in a fixation solution. Segments of groups 2 and 3 were distended and preserved with autologous heparinized arterial blood (AHB) (group 2) or normal saline (NS) solution (group 3) at a pressure of 30 mmHg and then kept under this pressure with fixing solution. Segments in groups 4 and 5 were distended at a constant pressure of 100 mmHg with AHB (group 4) or NS (group 5). SVs of groups 6 and 7 were distended at a constant pressure of 300 mmHg with AHB (group 6) or NS (group 7). Venous grafts were analyzed by SEM, and a score was used to measure the degree of endothelial damage. It was observed that SV segments preserved with NS had significantly greater endothelial damage both compared to the control group and to the groups submitted to distention pressures of 30 mmHg and 100 mmHg. Venous segments stretched with a pressure of 300 mmHg showed a soaring degree of damage, with considerable loss and separation of endothelial cells, extensive exposure of the basement membrane, and numerous fractures of the intima layer, with no differences regarding the preservation solution used. SV distended with a pressure of 30 mmHg showed scarce endothelial damage, compared to segments dilated with pressures higher than that. In summary, it is concluded that the preparation of SV using saline solution and with intraluminal distension pressures above 30 mmHg are factors related to greater damage to the endothelium of these grafts, which could reduce their patency after CABG. Additionally, adoption of blood as a preservation solution, in association to lower distension pressures were factors related to endothelial protection.

Key words: Coronary artery bypass; Saphenous vein; Saline Solution; Arterial blood; Distension Pressure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Segmento de VSM seccionado e canulado para infusão da solução de preservação e aplicação da pressão de distensão	43
Figura 2 – Segmento de VSM distendido sob pressão controlada com uso de seringa manometrada	43
Figura 3 – Aspecto de segmento de VSM já submetido a processamento e montado em <i>stub</i> para análise por MEV	45
Figura 4 – Aspecto, em MEV com magnificação de 150 vezes, da camada íntima de segmento de VSM analisado logo após exérese cirúrgica (Grupo Controle)	50
Figura 5 – Aspecto, em MEV com magnificação de 4319 vezes, da camada íntima de segmento de VSM analisado logo após exérese cirúrgica (Grupo Controle).	51
Figura 6 – Aspecto, em MEV com magnificação de 59 vezes, de segmento de VSM preservado em SAH e distendido com pressão de 30 mmHg (Grupo SAH 30).....	52
Figura 7 – Aspecto, em MEV com magnificação de trezentas vezes, de segmento de VSM preservado em SAH e distendido com pressão de 30 mmHg (Grupo SAH 30).....	53
Figura 8 – Aspecto, em MEV com magnificação de mil vezes, de segmento de VSM preservado em SAH e distendido com pressão de 30 mmHg (Grupo SAH 30).....	54
Figura 9 – Aspecto, em MEV com baixa magnificação, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 30 mmHg (Grupo SF 30)	55
Figura 10 – Aspecto, em MEV com magnificação de mil vezes, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 30 mmHg (Grupo SF 30).	56
Figura 11 – A Aspecto, em MEV com magnificação de 2500 vezes, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 30 mmHg (Grupo SF 30).....	57
Figura 12 – Aspecto, em MEV com magnificação de 5000 vezes, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 30 mmHg (Grupo SF 30).	58
Figura 13 – Aspecto, em MEV com magnificação de trezentas vezes, de segmento de VSM preservado em SAH e distendido com pressão de 100 mmHg (Grupo SAH 100).....	59
Figura 14 – Aspecto, em MEV com magnificação de quinhentas vezes, de segmento de VSM preservado em SAH e distendido com pressão de 100 mmHg (Grupo SAH 100).....	60
Figura 15 – Aspecto, em MEV com baixa magnificação, de segmento de VSM preservado	

em SAH e distendido com pressão de 100 mmHg (Grupo SAH 100).	61
Figura 16 – Aspecto, em MEV com magnificação de cem vezes, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 100 mmHg (Grupo SF 100).	62
Figura 17 – Aspecto, em MEV com magnificação de quinhentas vezes, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 100 mmHg (Grupo SF 100).	63
Figura 18 – Aspecto, em MEV com magnificação de 2000 vezes, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 100 mmHg (Grupo SF 100).....	64
Figura 19 – Aspecto, em MEV com magnificação de 12000 vezes, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 100 mmHg (Grupo SF 100).	65
Figura 20 – Aspecto, em MEV com magnificação de mil vezes, de segmento de VSM preservado em SAH e distendido com pressão de 300 mmHg (Grupo SAH 300).....	66
Figura 21 – Aspecto, em MEV com magnificação de 1500 vezes, de segmento de VSM preservado em SAH e distendido com pressão de 300 mmHg (Grupo SAH 300).....	67
Figura 22 – Aspecto, em MEV com magnificação de 2726 vezes, de segmento de VSM preservado em SAH e distendido com pressão de 300 mmHg (Grupo SAH 300).....	68
Figura 23 – Aspecto, em MEV com magnificação de 150 vezes, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 300 mmHg (Grupo SF 300).	69
Figura 24 – Aspecto, em MEV com magnificação de trezentas vezes, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 300 mmHg (Grupo SF 300).	70
Figura 25 – Aspecto, em MEV com magnificação de mil vezes, de segmento de VSM preservado em SF a 0,9% e distendido com pressão de 300 mmHg (Grupo SF 300).....	71
Figura 26 – Aspecto, em MEV com magnificação de 5000 vezes, de segmento de VSM preservado em SF a 0,9% e distendido com pressão de 300 mmHg (Grupo SF 300).....	72

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Avaliação do grau de dano estrutural global em segmentos de VSM expostos ou não (Controle) aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos ou não (Controle) à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg. **74**
- Gráfico 2** – Avaliação do grau de dano estrutural global em segmentos de VSM expostos aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg **76**
- Gráfico 3** – Avaliação do grau de separação de células endotélias em segmentos de VSM expostos ou não (Controle) aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos ou não (Controle) à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg **78**
- Gráfico 4** – Avaliação do grau de perda de células endotélias em segmentos de VSM expostos ou não (Controle) aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos ou não (Controle) à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg **79**
- Gráfico 5** – Avaliação do grau de exposição da membrana basal em segmentos de VSM expostos ou não (Controle) aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos ou não (Controle) à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg **80**
- Gráfico 6** – Avaliação do grau de exposição de colágeno fibrilar em segmentos de VSM expostos ou não (Controle) aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos ou não (Controle) à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg **81**
- Gráfico 7** – Avaliação da presença de fissuras na camada íntima de segmentos de VSM expostos ou não (Controle) aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos ou não (Controle) à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg **82**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados demográficos e características clínicas pré-operatórias dos doze pacientes estudados	49
Tabela 2 – Avaliação do grau de dano estrutural global em segmentos de VSM expostos ou não (Controle) aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos ou não (Controle) à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg	73
Tabela 3 – Avaliação do grau de dano estrutural global em segmentos de VSM expostos aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg	75
Tabela 4 – Avaliação do dano estrutural tecidual em segmentos de VSM expostos ou não (Controle) aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos ou não (Controle) à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg, por meio da análise de cinco parâmetros: grau de separação de células endoteliais, grau de perda de células endoteliais, grau de exposição da membrana basal, grau de exposição de colágeno fibrilar e presença de fissuras na camada íntima	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD	Artéria Coronária Direita
ACE	Artéria Coronária Esquerda
ACx	Artéria Circunflexa
AIA	Artéria Interventricular Anterior
AIP	Artéria Interventricular Posterior
ATI	Artéria Torácica Interna
ATID	Artéria Torácica Interna Direita
ATIE	Artéria Torácica Interna Esquerda
AVE	Acidente Vascular Encefálico
CEC	Circulação Extracorpórea
CRM	Cirurgia de Revascularização do Miocárdio
CO ₂	Dióxido de Carbono
CRM	Cirurgia de Revascularização do Miocárdio
DA	Artéria Descendente Anterior
DAC	Doença Arterial Coronariana
DP	Desvio Padrão
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
EuroScore	<i>European System for Cardiac Operative Risk Evaluation</i>
FE	Fração de Ejeção
FvW	Fator de von Willebrand
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IC	Intervalo de Confiança
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IMC	Índice de Massa Corpórea
LDL	<i>Low density cholesterol</i>
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

MMP	Metaloproteinases de matriz
NO	Óxido Nítrico
O ₂ ⁻	Superóxido
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
SAH	Sangue Arterial Autólogo Heparinizado
SF	Soro fisiológico a 0,9%
VCAM-1	Molécula de adesão vascular 1
VE	Ventrículo Esquerdo
VSM	Veia Safena Magna

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Embriologia e morfogênese do sistema venoso	19
2.2 Anatomia da veia safena magna	20
2.3 Histologia da veia safena magna	21
2.4 Doença arterial coronariana	24
2.5 Doença do enxerto venoso	30
2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	33
3 OBJETIVOS	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 Desenho do estudo	40
4.2 Local da pesquisa.....	40
4.3 Amostra.....	40
4.4 Protocolo do estudo	40
4.5 Análise estatística	47
5 RESULTADOS.....	49
5.1 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA VEIA SAFENA MAGNA	50
5.2 ANÁLISE COMPARATIVA DA INFLUÊNCIA DA SOLUÇÃO DE PRESERVAÇÃO E DAS PRESSÕES DE DISTENSÃO SOBRE O DANO ENDOTELIAL DA VSM	73
6 DISCUSSÃO	83
7 CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS.....	92
ANEXO – PARECER CONSUSBTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ.....	103
APÊNDICE – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	106

1 INTRODUÇÃO

As doenças do sistema cardiovascular aparecem como uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade no Brasil e em todo o mundo, sendo responsáveis por algo em torno de 30% dos óbitos e, dentro deste grupo de afecções, a doença arterial coronariana (DAC) mostra-se como aquela de maior impacto (MACK, GOPAL, 2016; NEUMANN *et al.*, 2019; PIEGAS *et al.*, 2009). Fisiopatologicamente, caracteriza-se pela formação de placas ateroscleróticas no lúmen das artérias coronárias, o que acarreta redução do fluxo sanguíneo arterial ao miocárdio, resultando em isquemia desta musculatura e, em casos graves, quando há rotura na placa, pode ocorrer necrose miocárdica com insuficiência cardíaca grave associada e óbito (HAJAR, 2017; MALAKAR, 2019).

Dentre as modalidades de tratamento disponíveis para os pacientes acometidos por DAC grave e sintomática, a cirurgia de revascularização do miocárdio (CRM) mostra-se como a abordagem cirúrgica mais amplamente realizada (NEUMANN *et al.*, 2019). Este procedimento, desde suas primeiras idealizações na década de 1950, é uma das áreas de maior destaque da cirurgia cardiovascular. Os trabalhos iniciais de Vineberg e Miller, nas décadas de 1940 e 1950, com o implante da artéria torácica interna esquerda (ATIE) na musculatura miocárdica ventricular, a chamada revascularização indireta, foram fundamentais para despertar maior interesse no tema (HEAD *et al.*, 2013; MELLY *et al.*, 2018; VINEBERG; MILLER, 1951). A primeira anastomose relatada com sucesso da ATIE para a artéria interventricular anterior (AIA), a chamada revascularização direta, foi realizada por Kolessov em 1964, procedimento que até os dias atuais é considerado padrão-ouro na revascularização miocárdica (KOLESSOV, 1967). Outro fato de suma relevância ocorreu em 1967 quando Favaloro *et al.* introduziram na prática médica a cirurgia de *by-pass* aortocoronariano com o uso da veia safena magna (VSM), cirurgia realizada até os dias atuais no tratamento da DAC grave (FAVALORO, 1968; HEAD *et al.*, 2013).

Na CRM, os enxertos sejam eles arteriais ou venosos, permitem que o sangue arterial chegue à artéria coronária distalmente ao sítio da lesão aterosclerótica, “*bypassando*” a lesão e permitindo a restauração de fluxo sanguíneo ao tecido miocárdico isquêmico.

Com o decorrer do tempo, estudos demonstraram que, apesar da grande melhora na morbimortalidade proporcionada pela cirurgia de *by-pass* aortocoronariano, a VSM apresentava perviedade limitada a longo prazo, com 60% destes enxertos permanecendo

viáveis após 10 anos de cirurgia (DE VRIES *et al.*, 2016; MCKAVANAGH *et al.*, 2017; NEUMANN *et al.*, 2019). Em curto prazo, isso ocorre devido a fenômenos trombóticos na VSM, e, em períodos mais tardios, a falha do enxerto deve-se sobretudo ao surgimento de hiperplasia da camada íntima, e desenvolvimento de doença aterosclerótica, aspectos ligados ao dano gerado pela exposição do endotélio venoso a condições não-fisiológicas para este tecido (DE VRIES *et al.*, 2016; HARSKAMP *et al.*, 2013; MILLS;EVERSON, 1975).

Considerando a possibilidade de falhas do enxerto venoso, com prejuízo clínico aos pacientes, muitos centros passaram a adotar o uso de enxertos arteriais, de modo a obter melhores resultados. Dentro deste grupo de enxertos, a ATIE, por suas características anatômicas e histológicas, acabou por mostrar-se como o enxerto padrão-ouro para a revascularização miocárdica, com estudos indicando perviedade acima de 90% em 10 anos e acima de 85% em 20 anos para este enxerto (CAMERON *et al.*, 1995; LOOP *et al.*, 1986).

Outros enxertos arteriais, como a artéria torácica interna direita, a artéria radial, a artéria gastroepiploica e a artéria epigástrica inferior, passaram então a ser utilizados no contexto da CRM (GAUDINO *et al.*, 2019; HE, 1999; TAGGART, 2013). No entanto, o fato da exérese e dissecação destes enxertos associar-se a aumento da morbidade e de complicações operatórias, sem que, como no caso da ATIE, houvesse demonstração absoluta de sua superioridade sobre os enxertos venosos, faz com que seu uso, atualmente, ainda não seja adotado indiscriminadamente (NEUMANN *et al.*, 2019). Esses fatores, associados à facilidade de exérese e uso, à disponibilidade e à baixa taxa de morbidade decorrentes da utilização da VSM fazem com que este ainda seja utilizado em 70% das CRM dos Estados Unidos da América (EUA) (D'AGOSTINO *et al.*, 2018; FERNANDEZ *et al.*, 2019; THOURANI *et al.*, 2019).

Tendo em vista todo esse contexto, a literatura científica vem destacando a relevância de metodologias que resultem em maior preservação do enxerto venoso durante sua exérese e preparo para uso como enxerto para revascularização miocárdica (CALISKAN *et al.*, 2019; BOUHOUT; ALI; PERRAULT, 2018; SAMANO; DASHWOOD; SOUZA, 2018; WISE; BROPHY, 2016; WOODWARD; ANTONIADES; TAGGART, 2016). Essas técnicas envolvem, primordialmente, a manutenção da integridade das camadas venosas, sobretudo do endotélio, porção cujo dano está associado ao precoce desenvolvimento de hiperplasia intimal e, por conseguinte, oclusão precoce dos enxertos (CALISKAN *et al.*, 2019; CHEUNG-FLYNN *et al.*, 2017; DE VRIES *et al.*, 2016).

Após exérese, a VSM usualmente é mantida em uma solução de preservação, a qual usualmente pode ser constituída por uma solução salina de soro fisiológico (SF), contendo cloreto de sódio a 0,9%, ou por solução sanguínea, com sangue arterial heparinizado (SAH) do paciente. Em ambas as situações a VSM é mantida a temperatura ambiente média de 20°C. Este enxerto venoso permanece nestas condições enquanto é realizada dissecação das artérias coronárias e preparo do sítio cirúrgico para confecção das anastomoses. Estudos atuais ainda indagam qual seria a solução que permitiria, durante este período, preservação das estruturas venosas com menor grau de lesão endotelial (BEN ALI; BOUHOUT; PERRAULT, 2018; CALISKAN *et al.*, 2019; FOUQUET *et al.*, 2020; WINKLER *et al.* 2016).

Antes da realização das anastomoses, a VSM é preparada sendo distendida com a solução na qual foi preservada. Dessa forma, é possível avaliar a presença de pontos em que há perda da integridade da parede venosa e, conseqüentemente escape de líquido, o que poderia resultar em sangramentos pós-operatórios. A distensão da VSM sob altas pressões é fator determinante de dano celular, sendo recomendada atualmente a distensão deste enxerto venoso a no máximo 100 mmHg, pressão semelhante à qual este estará submetido quando inserido no sistema arterial (CALISKAN *et al.*, 2019; DE VRIES *et al.*, 2016). No entanto, questionamentos ainda existem quanto à solução a ser utilizada para distensão, buscando-se também redução dos danos endoteliais (ANGELINI *et al.*, 1987; BONCHEK, 1980; GUNDRY *et al.*, 1980; LOESCH; DASHWOOD, 2018).

A avaliação do impacto destas metodologias de exérese, preservação e preparo da VSM sobre a estrutura a celular pode ser feita analisando-se a integridade ultraestrutural tanto do endotélio venoso como das camadas íntima, média e adventícia deste vaso. Dentre as metodologias utilizadas para esta análise está a microscopia eletrônica de varredura (MEV), também conhecida pelo termo em inglês, “*scanning electron microscopy*” (GUNDRY *et al.*, 1980; VASILAKIS, 2004).

A MEV utiliza feixes de elétrons que incidem sobre o material a ser estudado, rastreando a superfície desejada. Variações nesta superfície, como depressões e fissuras apresentam-se como escuros, enquanto protuberâncias e cristas mostram-se mais brilhantes. A reflexão dos elétrons pela superfície e a emissão de elétrons secundários de baixa energia por esta fazem com que seja formada uma imagem, este processo é captado por detectores que os convertem em um sinal enviado a uma tela, produzindo a imagem visualizada (MOHAMMED; ABDULLAH, 2019; SCHATTEEN, 2012; UL-HAMID, 2018).

O uso desta modalidade de microscopia em tecidos biológicos vem sendo expandido atualmente. A possibilidade de avaliar a estrutura de organelas e de microestruturas celulares sob diferentes condições, sejam de estresse térmico, químico ou pressórico, traz novas perspectivas acerca do funcionamento fisiológico, da adaptabilidade dos sistemas biológicos e dos processos fisiopatológicos envolvidos nas afecções, evidenciando em nível molecular como estes processos ocorrem, o que permite, além da compreensão destes processos biológicos, o desenvolvimento de novas metodologias para tratamento das doenças (SCHATTEN, 2012; ZHOU, 2006).

Considerando-se o exposto anteriormente, estudos envolvendo abordagens que promovam maior perviedade a longo prazo deste enxerto venoso mostram-se como fundamentais para o sucesso a longo prazo deste procedimento indispensável ao tratamento da DAC. O uso da MEV para avaliação de enxertos de VSM em diferentes condições de preservação e preparo cirúrgico é infrequente. Estudos utilizando tecnologias para precisa avaliação dos efeitos de heterogêneas técnicas intraoperatórias podem trazer novas perspectivas acerca da anatomia ultramicroscópica fisiológica do endotélio venoso, acerca do processo fisiopatológico envolvido no dano à VSM decorrente do preparo desta como enxerto na CRM, bem como permitir elaboração de novas metodologias, de modo a reduzir a lesão ao enxerto venoso, ampliando a sobrevida dos pacientes submetidos a CRM.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Embriologia e morfogênese do sistema venoso

O desenvolvimento do sistema cardiovascular embrionário inicia-se em meados da terceira semana de gestação, quando os nutrientes não mais são capazes de chegar a todo o tecido fetal por meio da difusão. Dessa forma, canais vasculares primitivos começam a ser formados pela diferenciação de angioblastos, células mesodérmicas extraembriônicas (NICHOLSON; GLOVICZKI, 2005).

Woolard, em 1922, postulou os princípios da formação do sistema vascular, dividindo-o em três fases. A fase um seria aquela em que este sistema é constituído exclusivamente por capilares resultantes da diferenciação dos angioblastos. Na fase dois, estruturas plexiformes, com redes vasculares intrincadas podem ser visibilizadas. Já na fase três, chamada também de fase de maturação, as grandes artérias e veias do corpo já se encontram formadas (WOOLARD, 1922).

Especificamente em relação ao sistema venoso, sua formação torna-se mais específica na quinta semana de gestação com a formação de três grandes pares de veias do embrião: veias vitelínicas, veias umbilicais e veias cardinais (EICHMANN, 2003; LOHR;MOUAWAD, 2018).

As veias vitelínicas transportam sangue do saco vitelínico para o seio venoso, formando um plexo ao redor do duodeno e do sistema digestivo embrionário. Essa estrutura posteriormente originará a drenagem venosa hepática e dos intestinos. As veias umbilicais, por sua vez, existem de forma pareada por um curto período na circulação fetal, uma vez que seu ramo direito e a porção proximal do ramo esquerdo são obliterados, permanecendo apenas a porção distal da veia umbilical esquerda, fornecendo sangue oxigenado da placenta para o fígado. Posteriormente forma-se o ducto venoso, comunicação entre o remanescente da veia umbilical esquerda e o canal hepatocárdico direito, bypassando os sinusoides hepáticos e fornecendo sangue mais diretamente para o coração embrionário. Por fim, as veias cardinais, que drenam a porção cefálica, e a porção posterior do embrião e que se desenvolvem de forma a formar as veias cavas, as veias renais, o sistema ázigos e as veias ilíacas.

O sistema vascular dos membros tem formação distinta, ao desenvolver-se como uma fina rede de capilares surgindo de ramos da aorta. Com a diferenciação e formação dos membros, seios venosos marginais são formados a partir desta rede de capilares e drenam o

sangue, inicialmente, para plexos venosos superficiais. Progressivamente, esses plexos venosos tornam-se mais complexos, conectando-se a veias profundas que se formam em pares com as artérias principais dos membros. Valvas são formadas ainda nessa fase inicial e acredita-se que o número total de valvas do sistema venoso é definido já no sexto mês de vida (GLOVICZKI *et al.*, 2017; LOHR; MOUAWAD, 2018; NICHOLSON; GLOVICZKI, 2005).

Com relação especificamente à formação do plexo venoso dos membros inferiores, Uhl e Gillot (2007) descreveram a teoria dos nervos guias da angiogênese. Tal teoria postula que os nervos axial, pré-axial (ventral) e pós-axial (dorsal) guiam a formação do plexo venoso. O nervo axial, que dará origem ao nervo ciático, induz a formação do plexo axial, o mais importante dos três durante as primeiras semanas de desenvolvimento, mas que regride na maioria dos indivíduos, estando presente em apenas 5% dos adultos. O nervo pré-axial, que dará origem ao nervo femoral, induz a formação do plexo que originará as veias femoral e safena magna. Já o pós-axial, nervo femoral cutâneo, induz a formação do plexo que dará origem à veia safena parva. Durante o restante do desenvolvimento, haveria a formação de anastomoses entre esses três plexos, as quais originarão as outras veias dos membros inferiores (GLOVICZKI, 2017; UHL; GILLOT, 2007).

2.2 Anatomia da veia safena magna

A apresentação anatômica da VSM é estudada desde a antiguidade, continuando como tema relevante até os dias atuais pela relevância deste vaso em diversos procedimentos diagnósticos e terapêuticos. O termo “safena” foi utilizado pela primeira vez por Avicena, em seu livro “O Cânone da Medicina”, escrito no século XI (CAGGIATI; BERGAN, 2002; MARCOVECCHIO, 1993). Uma vez que os árabes já realizavam sangrias com intuito terapêutico à época, quando necessário utilizar as veias dos membros inferiores para este fim, apenas a porção distal da VSM, mais visível, era utilizada. A porção proximal, por não ser facilmente acessível para flebotomias, era denominada “*el sefin*”, termo que pode ser traduzido como “escondido” em nossa língua vernácula (MARCOVECCHIO, 1993).

Anatomicamente, o sistema venoso superficial dos membros inferiores é uma das estruturas com maior variabilidade, mas algumas veias, como é o caso da VSM, apresentam aspectos anatômicos bem definidos (CAGGIATI; BERGAN, 2002; CAGGIATI; RICCI, 2000).

A VSM é a maior e mais contínua veia superficial dos membros inferiores. Apresenta cerca de 2-4 mm de diâmetro, e contém de dez a vinte valvas em sua extensão, a maioria

destas localizada no segmento distal. Diferentemente de outras veias do sistema venoso superficial, a VSM localiza-se mais profundamente no tecido subcutâneo, repousando sobre a fáscia muscular, sendo visível habitualmente apenas em sua origem na porção medial do tornozelo, anterior ao maléolo medial (CAGGIATI; RICCI, 2000; GLOVICZKI *et al.*, 2017).

Seguindo seu trajeto, a VSM ascende medialmente ao longo da perna, em proximidade com o nervo safeno, e, chegando ao joelho, seu trajeto aprofunda-se ainda mais na hipoderme, sendo ancorada à fáscia muscular profunda por uma lâmina de tecido conjuntivo, cuja denominação proposta é fáscia safena (CAGGIATI; BERGAN, 2002; LOHR;MOUAWAD, 2018). Ao longo da coxa, diversas veias tributárias da VSM, estão presentes, sendo a VSM posterior acessória, ou veia de Leonardo, um dos ramos mais recorrentes, ascendendo desde a parte posterior do maléolo medial até a coxa para juntar-se à VSM no terço proximal da coxa, e contribuindo para a drenagem das porções posteromediais dos membros inferiores (GLOVICZKI *et al.*, 2017).

Em sua porção proximal, e terminando seu trajeto, a VSM forma a junção safeno-femoral, confluência da VSM e de suas tributárias, com a veia epigástrica superficial inferior, veia pudenda externa e veia ilíaca circunflexa superficial. Este conjunto de veias drena para a veia femoral comum (GLOVICZKI *et al.*, 2017; LOHR;MOUAWAD, 2018).

2.3 Histologia da veia safena magna

Os tecidos venosos também apresentam peculiaridades em sua anatomia microscópica. Histologicamente, as paredes das veias têm características diferentes daquelas verificadas nas artérias, uma vez que estas transportam sangue do coração para os órgãos do corpo, enquanto aquelas são as responsáveis por permitir o retorno do sangue para o coração (MESCHER, 2018; REHFELD; NYLANDER;KARNOV, 2017).

Estes tecidos vasculares desenvolvem-se e adaptam-se de modo a suprir suas funções biológicas de transporte de oxigênio, de produtos do metabolismo celular, de hormônios, e de células imunes ao corpo. No processo de desenvolvimento dos angioblastos, descrito anteriormente, há a vasculogênese, em que as grandes artérias e veias do corpo são constituídas. Após isso, a formação vascular ocorre via angiogênese, onde novos vasos são formados a partir de estruturas já existentes e primitivamente especializadas (DELA PAZ; D'AMORE, 2009; NIKLASON;DAI, 2018; REHFELD; NYLANDER;KARNOV, 2017; SWIFT;WEINSTEIN, 2009).

As forças hemodinâmicas, como direção, pressão, e velocidade de fluxo não são os

únicos fatores que determinam a diferenciação de uma estrutura vascular primitiva em artéria ou veia. Cada uma dessas estruturas já expressa marcadores específicos, como alguns receptores tirosina quinase, receptores da família das efrinas, como EphrinB2 e EphB4, ilustrando que existem genes que codificam proteínas exclusivamente presentes em veias e artérias mesmo antes do coração entrar em funcionamento, e os estímulos externos ajudariam a direcionar essa diferenciação, mas não são seus determinantes (NIKLAISON;DAI, 2018; SWIFT;WEINSTEIN, 2009)..

Estas células especializadas, portanto, acabam formando estes vasos estrutural e funcionalmente distintos, que são as artérias e as veias, ambas compostas por três camadas, adventícia, média e íntima, que a depender do vaso em que se encontram apresentam estrutura distinta (REHFELD; NYLANDER;KARNOV, 2017; DELA PAZ; D'AMORE, 2009).

A camada adventícia contém um tecido conjuntivo constituído predominantemente por colágeno do tipo I, e elastina, além do *vasa vasorum*, estruturas vasculares que promovem o aporte de O₂ e outros metabólitos que não podem ser transportados exclusivamente por difusão proveniente do sangue do lúmen vascular (MESCHER, 2018; REHFELD; NYLANDER;KARNOV, 2017).

A camada média, por sua vez, é constituída predominantemente por feixes de músculo liso de espessura variável, interpostos com fibras elásticas e proteoglicanos. Em artérias, há uma camada de tecido conjuntivo entre as camadas média e adventícia, a chamada lâmina elástica externa (MESCHER, 2018; REHFELD; NYLANDER;KARNOV, 2017).

Por fim, a camada íntima é constituída pelo endotélio, tecido especializado constituído por uma camada de tecido pavimentoso e que controla os processos de resposta inflamatória e imune, tônus vascular, troca de metabólitos entre o lúmen vascular, dentre outros a serem explicitados posteriormente. Além disso, nesta camada tem-se o tecido subendotelial, composto por tecido conjuntivo frouxo, com esparsas fibras colágenas e células musculares lisas. Em artérias, entre a camada íntima e a camada média, nota-se a presença da lâmina elástica interna, outra estrutura de tecido conjuntivo mais compactado que atua para amenizar a ação das forças hemodinâmicas do sistema arterial e também auxilia na difusão de substâncias pela parede vascular (MESCHER, 2018; REHFELD; NYLANDER;KARNOV, 2017).

Nos tecidos venosos, em especial na VSM, foco desse trabalho, a estrutura da parede

vascular apresenta essas três camadas, mas com uma constituição característica. A camada íntima segue apresentando um tecido endotelial altamente especializado, e bem desenvolvido, com presença de valvas, projeções da túnica íntima constituídas por fibras elásticas e revestidas por endotélio, que atuam para, em situações fisiológicas, permitir o fluxo de sangue unidirecional para o coração (MESCHER, 2018). A camada subendotelial segue presente, com tecido conjuntivo frouxo, e esparsas células musculares lisas. Habitualmente não há uma lâmina elástica interna bem constituída entre as camadas íntima e média, e nesta estão presentes apenas músculo liso e fibras colágenas e elásticas. A camada adventícia é a mais espessa do tecido venoso, contendo tecido conjuntivo frouxo, e um discreto *vasa vasorum* e *nervi vasorum* (MARIN *et al.*, 1994; MILROY *et al.*, 1989; THIENE *et al.*, 1980)

Sobre o endotélio, algumas considerações devem ser feitas. Este tecido atua em diversos processos fisiológicos e sua integridade é fundamental tanto para a homeostase corporal, quanto para a perviedade de enxertos vasculares. O endotélio constitui uma monocamada de células que forma uma barreira entre o sangue e o líquido intersticial. Estima-se que existam $1,6 \times 10^{13}$ destas células e que estas recobram uma área de 7 m^2 em cada indivíduo. Células endoteliais quiescentes produzem ativamente substâncias antitrombóticas e anti-inflamatórias, além de regularem a permeabilidade proteica. No entanto, as células endoteliais apresentam alto grau de especificidade na produção destes compostos e em sua organização a depender do local em que se inserem, ou de sua exposição a determinados estímulos (MESCHER, 2018; RIBATTI, 2016).

Os capilares de determinados órgãos apresentam endotélio com características únicas. Enquanto no cérebro, retina, músculo estriado esquelético e cardíaco e ovários nota-se um endotélio contínuo, glândulas endócrinas e capilares peritubulares renais apresentam endotélio fenestrado, e fígado, baço e medula óssea já apresentam células endoteliais descontínuas (MESCHER, 2018; REHFELD; NYLANDER; KARNOV, 2017; RIBATTI, 2016).

Em análise do microambiente celular, diversos estímulos impactam a função endotelial, sobretudo no seu controle da trombogenicidade e da inflamação vascular. O balanço na produção e depleção de óxido nítrico (NO), endotelinas, e de prostaglandinas pelas células endoteliais, por exemplo, tem papel fundamental para a manutenção de adequado tônus vascular e equilíbrio ácido-básico. Com a alterações neste equilíbrio na há aumento na quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO), sobretudo grupos superóxido (O_2^-), que atuam aumentando a regulação de genes produtores de células musculares lisas vasculares,

hiperplasiando estas células, bem como recrutamento leucocitário, aumento na concentração de citocinas pro-inflamatório, e, por conseguinte, hiperinflamação e disfunção celular (BUCCIARELLI *et al.*, 2009; ERIKSSON *et al.*, 2005; RIBATTI, 2016; WARD *et al.*, 2017).

Estes processos também modificam a expressão de moléculas de adesão, como molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1), E-selectina e molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), aumentando a trombogenicidade vascular. Esta ativação seletiva de células endoteliais de diferentes órgãos, com expressão destas moléculas está relacionada ao processo fisiopatológico de diversas doenças, como as vasculites, as neoplasias, as patologias cerebrais como a doença de Alzheimer, a insuficiência cardíaca e, em especial, a DAC (COLOMBO *et al.*, 2014; GANDA *et al.*, 2010).

2.4 Doença arterial coronariana

Dentro do grupo das doenças cardiovasculares, a DAC mostra-se como aquela de maior impacto, uma vez que é a maior responsável pela incidência de insuficiência cardíaca e óbito em países desenvolvidos, com crescente relevância também nas nações em desenvolvimento (LIBBY; THEROUX, 2005; MACK; GOPAL, 2016; NEUMANN *et al.*, 2019).

A fisiopatologia desta afecção é complexa, mas está bem estabelecido que a presença de fatores como dislipidemia, tabagismo, hiperglicemia, hipertensão arterial sistêmica e obesidade possuem papel importante em seu surgimento e progressão. Uma vez que esses fatores promovem um aumento do estresse e das lesões oxidativas e inflamatórias sobre o endotélio das artérias coronárias, há lesão endotelial direta com estímulo à liberação de VCAM-1, ICAM-1, P-selectina e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), havendo rápido recrutamento de leucócitos (HAJAR, 2017; MALAKAR, 2019; WARD *et al.*, 2017).

Uma vez estabelecida a migração leucocitária neste sítio há ativação da via RAS, com afrouxamento das ligações intercelulares no endotélio, o que facilita a migração de macrófagos do lúmen vascular para a camada íntima destes vasos. Após migrarem e agruparem-se à camada endotelial, este grupo de macrófagos rico em *low-density cholesterol* (colesterol de baixa densidade) (LDL), chamados agora de células espumosas, passam a produzir uma matriz extracelular rica em metaloproteinases, que promovem a ligação de lipoproteínas a estas células, induzindo mais estresse oxidativo, com progressiva formação das placas ateromatosas. Estas placas são estruturas focais, localizadas nas camadas íntima e média

compostas por um centro repleto de células espumosas e recobertas por células endoteliais e uma capa fibrosa no lúmen vascular (HAJAR, 2017; MALAKAR, 2019; NABEL;BRAUNWALD, 2012).

Dentro do escopo fisiopatológico, é fundamental evidenciar que as lesões típicas da DAC se localizam predominantemente nas porções proximais das artérias e em suas bifurcações ou trifurcações, com o leito distal arterial sendo usualmente poupado, o que constitui uma justificativa fisiopatológica para o sucesso da CRM com *by-pass* das lesões ateroscleróticas, uma vez que com o procedimento, sangue oxigenado é levado às porções do miocárdio distais às lesões (HEAD *et al.*, 2013; LIBBY;THEROUX, 2005; NEUMANN *et al.*, 2019).

Todo esse processo ocorre ao longo de dezenas de anos, com progressivo remodelamento das artérias até que haja ou estenose importante do diâmetro intraluminal, ou ruptura da placa, com liberação de material trombogênico para o lúmen arterial, promovendo quadros clínicos que vão desde a angina estável, até as síndromes coronarianas agudas (HAJAR, 2017; MANN;DAVIES, 1999; NABEL;BRAUNWALD, 2012).

2.4.1 Anatomia Coronariana

O conhecimento anatômico das artérias coronárias tem papel fundamental na compreensão fisiopatológica da DAC e de suas indicações cirúrgicas.

Nos seios coronarianos direito e esquerdo da aorta ascendente situam-se as origens da artéria coronária direita e esquerda respectivamente. A artéria coronária direita (ACD) em seu curso passa anteriormente entre a aurícula direita e o cone pulmonar onde origina o **ramo atrial anterior**, uma artéria que, em 60% dos indivíduos dá origem à **artéria do nó sinoatrial**. Ela segue em volta do coração podendo originar ramos **ventriculares marginais** para a região anterior do ventrículo direito. Ao alcançar, em sua porção posterior, uma área chamada **cruxcordis**, origina a artéria ventricular posterior e em aproximadamente 90% dos casos origina a **artéria interventricular posterior (AIP)**. A artéria coronária que originar essa última é nominada como dominante (FISS, 2007; JAMES, 1965).

A artéria coronária esquerda (ACE) usualmente tem um tronco, que mede em média 2 cm, possui maior calibre que a direita e cursa lateralmente entre a base do tronco da artéria pulmonar e o átrio esquerdo. Ao chegar na altura do sulco atrioventricular, usualmente divide-

se em dois ramos, a **artéria interventricular anterior (AIA)**, ou **descendente anterior (DA)**, e a **artéria circunflexa (ACx)**. Vale ressaltar que a AIA tem fundamental importância para o miocárdico, uma vez que com seus ramos septais e diagonais ela é responsável pelo suprimento sanguíneo de cerca de 50% da massa do coração, fato que impacta mais ainda a DAC em relação essa artéria. A artéria circunflexa origina os ramos marginais que irriga a porção posterior do ventrículo esquerdo (VE) e em 10% das vezes emite o ramo interventricular posterior, passando nesse caso a ser a artéria dominante (FISS, 2007; JAMES, 1965; MEDRANO-GRACIA, 2016).

2.4.2 Aspectos clínicos e indicações cirúrgicas

Clinicamente, a DAC pode estar manifesta em três apresentações principais: angina estável; angina instável e infarto agudo do miocárdio (IAM) sem elevação do segmento ST; e IAM com elevação do segmento ST. A CRM pode estar indicada e ser efetiva em todas as três formas de apresentação da doença, mas atualmente é na angina estável onde a CRM apresenta seu maior número de indicações cirúrgicas. Isso ocorre pois, nas outras apresentações, a terapêutica percutânea com angioplastia com ou sem o uso de stents intracoronários é preferível, sendo o tratamento cirúrgico aplicável quando esta abordagem menos invasiva é inviável ou não é factível para tratamento do paciente (DOENST *et al.*, 2019; JOSEPH *et al.*, 2018; NEUMANN *et al.*, 2019).

Focando-se nos pacientes com angina estável, a CRM encontra-se indicada nos casos em que a terapia medicamentosa não foi eficaz, ou quando o prognóstico for consideravelmente melhor com a intervenção cirúrgica (NEUMANN *et al.*, 2019; WINDECKER *et al.*, 2019).

Além dos critérios clínicos, o sucesso de qualquer intervenção cirúrgica depende de um minucioso planejamento de todo o procedimento pela equipe que assiste ao paciente. Para definição da abordagem terapêutica, é necessária a avaliação anatômica da extensão da DAC, dos fatores risco de cada paciente, da decisão de quais artérias serão revascularizadas, e qual abordagem, percutânea ou cirúrgica, para revascularização é mais adequada ao caso (JOSEPH *et al.*, 2018; NEUMANN *et al.*, 2019; WINDECKER *et al.*, 2019).

Dentre os exames complementares, a cineangiocoronariografia adquire papel fundamental ao permitir a avaliação anatômica do grau de comprometimento arterial pela DAC, sendo indispensável para definição da terapêutica. Outros exames como o

ecocardiograma, o eletrocardiograma, a angiografia por tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética também podem ser importantes (WINDECKER *et al.*, 2019).

Visando esclarecer se a abordagem percutânea apresentava melhores resultados do que a CRM no tratamento dos pacientes com angina estável, foi elaborado, em 2006, o estudo SYNTAX (The SYnergy between percutaneous coronary intervention with TAXus and cardiac surgery study: Design, rationale, and run-in phase) (ONG *et al.*, 2006). Neste trabalho prospectivo, envolvendo 85 instituições da Europa e dos Estados Unidos, avaliou pacientes com angina estável que apresentavam DAC em três ou mais vasos e ou no tronco sem intervenções cirúrgicas prévias, visando esclarecer qual tipo de tratamento promovia melhor prognóstico e menor ocorrência de complicações maiores, tais como, acidente vascular encefálico (AVE), óbito, IAM, e necessidade de reintervenção (ONG *et al.*, 2006; SERRYUS *et al.*, 2009; THUIJS *et al.*, 2019).

Para isto, as lesões ateromatosas foram classificadas pela sua gravidade, segundo um escore anatômico proposto pelo próprio estudo, com os pacientes agrupados de acordo com o somatório geral dos escores de cada lesão: escores baixos (de 0 a 22), intermediários (de 23 a 32) e altos (>32). Estes indivíduos foram randomizados para tratamento percutâneo com usos de *stents* farmacológicos, ou CRM. O que se observou foi que nos pacientes com lesões críticas ou mais complexas anatomicamente, que apresentavam escores acima de 23, a CRM apresentou taxas significativamente menor dos desfechos avaliados do que a abordagem percutânea em cinco anos de seguimento (29,7% vs. 46,5% respectivamente) (MOHR *et al.*, 2013; SERRYUS *et al.*, 2009).

Os guidelines atuais de revascularização miocárdica indicam que a CRM é o procedimento de escolha em pacientes com angina estável e que apresentam lesões de maior complexidade anatômica, sobretudo quando há acometimento do tronco da ACE e/ou da porção proximal da AIA (DOENST *et al.*, 2019; JOSEPH *et al.*, 2018; NEUMANN *et al.*, 2019).

2.4.3 Tratamento Cirúrgico da DAC

A CRM, conforme ilustrado anteriormente, é um procedimento realizado há mais de cinquenta anos para o tratamento da DAC, e que segue sendo de grande relevância atualmente. As diretrizes enfocam alguns aspectos relevantes envolvidos neste procedimento, indicando aqueles que apresentariam maior benefício, dentre estes aspectos encontra-se a

escolha dos enxertos, uma vez que são estes novos condutos que possibilitarão a passagem do sangue arterializado para o tecido miocárdico isquêmico (NEUMANN *et al.*, 2019; WINDECKER *et al.*, 2019).

Diversos enxertos foram estudados ao longo do tempo, sendo recomendado o uso predominante de enxertos arteriais. Dentre estes, a artéria torácica interna (ATI), artéria radial e alguns outros merecem destaque (GAUDINO *et al.*, 2019; HE, 1999; TAGGART, 2013).

A ATI é considerada o enxerto padrão-ouro para revascularização miocárdica devido aos excelentes resultados clínicos apresentados pelo seu uso, sobretudo com a anastomose da ATIE para a AIA. O fato de seu endotélio ser particularmente pouco suscetível à doença aterosclerótica, e por este vaso poder ser anastomosado às artérias coronárias de forma pediculada, sem necessidade de manuseio da aorta ascendente, são fatores que contribuem para isso (CAMERON *et al.*, 1995; LOOP *et al.*, 1986; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017; MILLS, 1982). Embora muitos centros realizem a dissecação bilateral das ATIs, é válido ressaltar que, em pacientes idosos, diabéticos, obesos e naqueles com outras comorbidades importantes, isso está associado à maior incidência de mediastinite, complicação grave no pós-operatório de cirurgia cardiovascular e que ocorre devido à redução importante na vascularização esternal quando esse enxerto é dissecado bilateralmente (ALDEA *et al.*, 2016; TOUMPOULIS; THEAKOS; DUNNING, 2007).

A artéria radial é a segunda opção de enxerto arterial na maioria dos centros, está sendo crescentemente utilizada em virtude de sua perviedade a longo prazo ser comparável, ou até superior à da VSM segundo alguns estudos. No entanto, ainda são relatadas taxas elevadas de oclusão devido à competição de fluxo existente quando estes enxertos revascularizam coronárias com lesões não críticas (estenoses < 70%). Outro ponto a ressaltar é que sua exérese está relacionada a complicações neurológicas no membro em que a artéria foi dissecada em até 30% dos casos (ALDEA *et al.*, 2016; DENTON *et al.*, 2001; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017; NEUMANN *et al.*, 2019).

Outros enxertos arteriais como a artéria gastroepiploica e a artéria epigástrica inferior podem ser utilizados, mas as dificuldades de exérese e o aumento da morbidade comprometem a difusão de seu uso. Enxertos artificiais de dácron e politetrafluoroetileno (PTFE) também já foram objeto de estudo, mas sem resultados satisfatórios (ALDEA *et al.*, 2016; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017).

Dentre os enxertos venosos, a VSM, por sua vez, é o mais utilizado na CRM. A primeira utilização desta veia para como enxerto aortocoronariano aconteceu em 1962, quando o Dr. David Sabiston Jr. anastomosou um segmento de VSM da aorta para a ACD, notando-se fluxo sanguíneo pulsátil no enxerto e na artéria coronária. No entanto o paciente desta cirurgia faleceu no pós-operatório devido a um AVE, e um estudo angiográfico não pode ser realizado (SABISTON JR, 1997). Dois anos depois, os médicos Dr. Edward Garrett, Dr. Jimmy Howell, e Dr. Michael DeBakey, realizaram com sucesso uma revascularização miocárdica com uso de segmento venoso, publicando resultados angiográficos satisfatórios nove anos após o procedimento (GARRETT; DENNIS; DEBAKEY, 1973). Mas foram os trabalhos de Rene Favaloro, na Cleveland Clinic, no final da década de 1960 que padronizaram e popularizaram o uso da VSM na CRM (FAVALORO, 1968; FAVALORO, 1971; MUELLER; ROSENGART; ISOM, 1997).

Nestas últimas cinco décadas de uso, notou-se que, a despeito da considerável melhora clínica obtida com a revascularização com uso destes enxertos venosos, um aspecto continuava a ser desfavorável: a perviabilidade de apenas 60% destes enxerto em dez anos de seguimento e isso motivou o uso de outros condutos, como os enxertos arteriais já ilustrados anteriormente (CALISKAN *et al.*, 2019; DE VRIES *et al.*, 2016). No entanto, devido à sua acessibilidade e aos baixos índices de morbidade relacionados à sua dissecação, a VSM continua a ser amplamente utilizado, tanto em situações de emergência, como quando há indisponibilidade para o uso de enxertos arteriais, ou quando alguns serviços apresentam bons resultados com seu uso rotineiro (D'AGOSTINO *et al.*, 2018; NEUMANN *et al.*, 2019).

Esses fatores promoveram, sobretudo nos últimos anos, reflexões sobre a fisiopatologia da doença do enxerto venoso e de como a abordagem cirúrgica deste conduto vascular poderia ser modificada de modo a preservá-lo e melhorar os resultados clínicos com seu uso. Estudos ilustrando que um menor trauma durante a exérese cirúrgica da VSM, além de melhor manuseio perioperatório do enxerto, com uso de menores pressões de distensão intraluminal, e de soluções de preservação com composições mais fisiológicas reduziriam os danos endoteliais e melhorariam os resultados clínicos do uso da VSM (DEB *et al.*, 2019; CALISKAN *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2017; SANDNER *et al.*, 2020).

2.5 Doença do enxerto venoso

Com a ampliação do uso da VSM como conduto em cirurgias vasculares, e com as

limitações de perviedade notadas com isso, diversos pesquisadores passaram a investigar as causas da obstrução e perda de função dos enxertos venosos. Nessa patologia denominado doença do enxerto venoso, a inflamação vascular, a hiperplasia da camada íntima e o desenvolvimento acelerado de aterosclerose são os principais processos fisiopatológicos envolvidos (DAVIES; HAGEN, 1995; DE VRIES *et al.*, 2016; MOTWANI; TOPOL, 1998).

A falha do enxerto venoso é dividida em três fases, a depender do tempo entre o procedimento e este desfecho do conduto. A fase aguda é definida quando há oclusão do enxerto de horas até trinta dias após o implante, a fase precoce é quando ocorre de um mês até um ano do implante, e a fase tardia dá-se quando a oclusão do enxerto acontece um ano após seu implante. Essa divisão torna-se relevante devido ao fato de que estas fases apresentam processos fisiopatológicos distintos que justificam sua ocorrência (DAVIES; HAGEN, 1995; DE VRIES *et al.*, 2016; GOOCH *et al.*, 2016; WARD *et al.*, 2017).

Nas falhas do enxerto agudas e precoces, o fator causador de oclusão da VSM é a trombose, habitualmente causada por excessivo dano endotelial. A exérese cirúrgica do enxerto venoso é o primeiro fator que contribui para a destruição e perda de função das células endoteliais. Nesse processo, com uso das técnicas convencionais, há remoção do *vasa vasorum* e do tecido perivascular, induzindo isquemia com posterior lesão de reperfusão no enxerto, além de trauma direto à parede vascular. Além disso, habitualmente há hiperdistensão da veia, com infusão de soluções no lúmen vascular sob altas pressões, que podem chegar a mais de 300 mmHg (DE VRIES *et al.*, 2016; LOGERFO; HAUDENSCHILD; QUIST, 1984). Em resposta a estes insultos, as células endoteliais venosas podem sofrer dano irreversível, deixando de exercer quaisquer funções, como também podem ter ativação citotóxica, com produção de ERO, e iniciando a expressão de citocinas pró-trombóticas e pró-inflamatórias. O aumento na produção de íons superóxido nesse processo de lesão celular também resulta na redução da expressão das enzimas produtoras de NO, prejudicando a capacidade de vasodilatação do enxerto e ocasionando maior dano tecidual (GOOCH *et al.*, 2016; HASKAMP *et al.*, 2013).

A destruição e disfunção da camada endotelial faz com que a camada subendotelial fique exposta, com proteínas da matriz extracelular, como colágeno, e elastina tendo contato direto com o sangue, produzindo um ambiente trombogênico, algo exacerbado pela deficiência de NO e de prostaciclina. Há ativação do fator tecidual, agregação plaquetária, com produção de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fibrinogênio,

fibronectina, fator de von Willebrand (FvW), e de selectinas, com maior adesão leucocitária e posterior deposição de fibrina, possivelmente acarretando na formação de grandes trombos que ocluem o lúmen vascular DAVIES; HAGEN, 1995; WARD *et al.*, 2017).

Com a introdução do enxerto venoso na circulação arterial, outras grandes mudanças ocorrem no microambiente em que a veia se insere e na nova configuração hemodinâmica a qual este enxerto está submetido (GOOCH *et al.*, 2016; OWENS, 2010). Os vasos são expostos a forças mecânicas que são transmitidas ao longo da espessura e do comprimento destas estruturas, a destacar a pressão hidrostática, o estresse circunferencial, e as forças de cisalhamento (DOBRIN; LITTOOY; ENDEAN, 1989; GOOCH *et al.*, 2016; OWENS, 2010).

A pressão hidrostática é exercida pelo próprio líquido intravascular e, no sistema venoso, varia de dez até setenta mmHg, sendo estes últimos valores obtidos em situações mais extremas de hipervolemia e/ou de exercício físico. Com a passagem para o sistema arterial, estas pressões praticamente dobram, chegando a 80 ou 100 mmHg em média, e assim permanecendo constantemente, com esses valores sendo ainda maiores em pacientes com hipertensão arterial sistêmica (GOOCH *et al.*, 2016; OSCHNER; COLP JR; BURCH, 1951; STICK; HIEDL; WITZLEB, 1993).

O estresse circunferencial refere-se à força que o líquido exerce para distender o vaso, paralelamente à orientação das fibras. Com o aumento da pressão hidrostática, também há aumento no estresse circunferencial no enxerto venoso, o qual dobra de valor com a introdução da VSM no sistema arterial (GUSIC *et al.*, 2005).

As forças de cisalhamento, por sua vez, são forças tangenciais, que atuam longitudinalmente sobre a camada íntima vascular, resultantes do atrito decorrente da movimentação de um líquido dentro de uma estrutura sólida. O estresse de cisalhamento é uma das forças mais relevantes para o remodelamento das células endoteliais, regulando sua fisiologia e estrutura celular (BAEYENS *et al.*, 2016; WARD *et al.*, 2017; ZAKKAR; ANGELINI; EMANUELI, 2016). No sistema venoso, estas forças variam de 0 a 4 dynes/cm², enquanto no sistema arterial chegam a 30 dynes/cm² (DE VRIES *et al.*, 2016; GOOCH *et al.*, 2016).

A parede do tecido venoso difere consideravelmente dessa estrutura nas artérias, conforme ilustrado anteriormente. Na VSM há quantidade significativamente menor de músculo liso vascular na camada média, nem camadas circunferenciais organizadas de

colágeno e elastina, uma composição que, nas artérias atua para acomodar passivamente a maior pressão no sistema arterial (MESCHER, 2018; WARD *et al.*, 2017). Além disso, as células endoteliais venosas apresentam junções intercelulares mais frouxas do que aquelas vistas no tecido arterial. Desprovida dessas estruturas, a VSM fica mais suscetível às forças de cisalhamento tendo que se adaptar a toda essa nova configuração mecânica, sofrendo processo de arterialização (DE VRIES *et al.*, 2016; WARD *et al.*, 2017).

A conformação geométrica da VSM começa então a alterar-se. Há dilatação do vaso, e ativação das células endoteliais devido às alterações citoesqueléticas decorrentes das novas forças mecânicas, que, no enxerto venoso arterializado, atuam em até nove direções (BAEYENS *et al.*, 2016; DOBRIN; LITTOOY; ENDEAN, 1989; GOLLEDGE *et al.*, 2000). A ativação endotelial induz maior expressão de genes que transcrevem a produção de MCP-1, ativação da via Ras, e produção de fator nuclear Kappa-B (NF-kB). Com esse microambiente pró-inflamatório, as células musculares lisas vasculares perdem sua forma quiescente, passando para um estado de menor diferenciação e maior proliferação, juntamente com fibroblastos da camada adventícia. Essas células passam a migrar para a camada íntima, expressando fatores como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), endotelina-1, fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), PDGF e outras substâncias que estimulam maior recrutamento de fibroblastos e células musculares lisas. Ao longo do tempo, a camada íntima celular torna-se hiperplásica, repleta destes conjuntos celulares, gradativamente reduzindo o lúmen vascular e podendo ocluir-lo a ponto de inviabilizar a sua função (DE VRIES *et al.*, 2016; DOBRIN; LITTOOY; ENDEAN, 1989; MITRA; GANGAHAR; AGRAWAL 2006).

O processo de hiperplasia intimal pode ser acelerado e agravado na presença de comorbidades como hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes mellitus tipo II e hipercolesterolemia. Somando-se aos estímulos mecânicos, haveria ainda mais substrato inflamatório no endotélio venoso, induzindo maior migração de células para a camada íntima e maior produção de metaloproteinases de matriz (MMP), que degradam fibras colágenas e promovem maior distorção das camadas vasculares (DAVIES; HAGEN, 1995; MOTWANI; TOPOL, 1998; SHARON *et al.*, 2016). Em especial com aumento nos níveis de LDL, há ativação das vias celulares promotoras de aterosclerose, e, uma vez que o tecido das lesões hiperplásicas intimais é ávido pela absorção dessas partículas lipídicas, células espumosas e placas ateroscleróticas começam a formar-se, contribuindo para a falência do enxerto venoso

(KLYACHKIN *et al.*, 1993).

Diversos autores ilustram que medidas perioperatórias, como menor distensão venosa, uso de soluções de preservação mais fisiológicas, e exérese venosa com menor trauma ao vaso e preservação do *vasa vasorum* e do tecido vascular, podem reduzir o dano endotelial imediato a esses enxertos, e diversos estudos indicam que os segmentos venosos que logo após exérese apresentam menor grau de dano endotelial, estão menos suscetíveis a trombose e ao desenvolvimento de hiperplasia intimal (KIM *et al.*, 2017; LOESCH; DASHWOOD, 2018). A produção de novas células endoteliais, com re-endotelização do enxerto começa a ocorrer 72 horas após o procedimento cirúrgico, e esse processo pode ser facilitado com menor dano inicial ao enxerto, e com posterior controle rígido de comorbidades, reduzindo o risco de complicações pós-operatórias (CALISKAN *et al.*, 2019; DE VRIES *et al.*, 2016; HARSKAMP *et al.*, 2013; WARD *et al.*, 2017).

2.6 Microscopia eletrônica de varredura

2.6.1 Princípios e aspectos históricos

A necessidade humana de estudar estruturas muito pequenas, não visíveis naturalmente estimulou a busca pelo desenvolvimento de equipamentos que viabilizassem este intuito.

Inicialmente, é importante definir que a resolução é definida como a menor distância na qual dois pontos podem ser vistos como distintos. O olho humano apresenta resolução de 200 μm , ou seja, objetos cuja distância entre si é menor que esta medida não podem ser distinguidos, aparentando ser apenas um objeto à nossa visão. Micróbios e células são exemplos de estrutura com dimensões menores que a resolução do olho humano e que, embora sua existência fosse imaginada, só puderam ser visibilizados com o advento do microscópio óptico, instrumento no qual a luz é desviada com uso de lentes de modo a magnificar a imagem e aumentar nossa capacidade de visibilizar certos detalhes (ROSE, 1948; UL-HAMID, 2018; ZHOU *et al.*, 2006).

Um microscópio óptico e o olho humano utilizam a luz, em seu comprimento de onda visível ($\lambda = 380\text{--}760\text{ nm}$), para que possamos observar as estruturas. Este tipo de microscópio apresenta uma resolução que chega a 0,2 μm , permitindo que a maioria das células e organismos pudesse ser visto e estudado. No entanto, havia uma necessidade crescente de observar-se estruturas, sejam estas biológicas ou não, com maior detalhamento, fazendo com

que novas formas de aquisição de imagens fossem pesquisadas, superando o limite imposto pelas lentes e técnicas de magnificação dos microscópios ópticos (UL-HAMID, 2018; ZHOU *et al.*, 2006).

Com o estudo dos elétrons e a descoberta de que esta partícula pode se comportar como partícula e como onda, ainda no século XIX, imaginou-se que se imagens pudessem ser formadas a partir de comprimentos de onda diminutos, como os obtidos utilizando feixes de elétrons, obter-se-ia maior detalhamento de imagens, uma vez que quanto menor é o comprimento de onda usado para criar uma imagem, maior é a resolução possivelmente obtível. Partindo desse princípio, iniciaram-se os estudos para criação de um microscópio eletrônico, ou seja, com uso de feixe de elétrons direcionado sobre uma estrutura (HAGUENAU *et al.*, 2003; OATLEY, 1982).

A Alemanha foi o local onde diversos protótipos foram criados, gerando resultados inovadores, dentre os quais podemos destacar o trabalho de Max Knoll e Ernst Ruska, que, ainda em 1935, foram os desenvolvedores do conceito aplicado de microscopia eletrônica, a partir do qual construiu-se um equipamento que seguia os mesmos princípios do microscópio óptico, com a substituição do feixe de luz por um feixe de elétrons. Nos anos seguintes, lentes eletrostáticas e melhorias nas metodologias para emissão de elétrons e captação de seus sinais foram desenvolvidas, porém apenas em 1965, em Cambridge, Inglaterra, foi criado o primeiro um microscópio eletrônico comercialmente disponível, o “Stereoscan”, com resolução de 15-20 nm. Equipamentos atuais evoluem de modo que têm resolução consideravelmente superior, chegando a 0,1 nm (BOGNER *et al.*, 2007; HAGUENAU *et al.*, 2003; OATLEY, 1982; UL-HAMID, 2018).

2.6.2 Composição do microscópio eletrônico e formação de imagens

Constitucionalmente, um microscópio eletrônico apresenta três estruturas básicas: uma coluna de elétrons, a câmara de espécimes e um sistema computadorizado para formação das imagens e controle do equipamento (OATLEY, 1982; UL-HAMID, 2018).

A coluna de elétrons consiste em uma estrutura cilíndrica localizada acima da câmara onde ficam os espécimes, e que contém logo em seu topo, um conjunto cátodos e eletrodos conectados a uma fonte de alta tensão que é responsável pela produção e emissão dos elétrons, os quais são acelerados ao longo da coluna em velocidades diferentes, que variam de 2-30 kV, a depender da estrutura analisada e das informações que o pesquisador deseja obter.

Nessa coluna, cujo interior é mantido constantemente em vácuo durante a operação do microscópio, existem lentes eletromagnéticas, e defletores de varredura que, respectivamente, focalizam os elétrons emitidos e os direcionam para as áreas do espécime que devem ser analisadas, permitindo uma varredura da amostra, processo do qual provém a denominação MEV (HAGUENAU *et al.*, 2003; UL-HAMID, 2018; ZHOU *et al.*, 2006).

Ao fim da torre descrita, há a câmara onde se localiza a bandeja, em que se coloca o objeto de interesse para estudo. Essa câmara também está sob vácuo para evitar deslocamentos indesejados na trajetória do feixe de elétrons. Na bandeja há espaços para acomodação de mais de uma amostra em pequenos discos, que podem translacionar nos três eixos (x,y,z) e rotacionar no eixo de fixação. Esses movimentos são necessários para manipular o nível de aumento da imagem, mudar a amostra observada, e retirar os espécimes da câmara (UL-HAMID, 2018; ZHOU *et al.*, 2006).

Uma vez determinada a quantidade, direção e velocidade de aceleração dos elétrons, estes incidem sobre a amostra e colidem com seus átomos, gerando diferentes formas de emissões energéticas, como elétrons, raios-x e fótons, sendo captadas por seus respectivos detectores, que irão gerar sinais para formação da imagem ou para elucidação constitucional do espécime. Quando a energia dessa interação é liberada na forma de elétrons, ela pode ser feita de duas formas, elétrons retro espalhados e elétrons secundários. Os elétrons retro espalhados originam-se a partir de uma colisão elástica entre o feixe de elétrons e os átomos da amostra, de tal forma a liberar elétrons de nível energético maior que 50 eV e com ângulos de deflexão maior que 90°. Esse tipo de emissão dará informações topográficas e constitucionais do material estudado. Já os elétrons secundários, são emissões de baixo nível energético, resultantes das alterações eletrosféricas produzidas nos átomos da amostra pelo feixe de elétrons. Por serem de baixo nível energético, elas são emitidas a curtas distância da amostra, possibilitando um maior contraste topográfico da imagem formada. A emissão de raios-x e de catodoluminescência, como nos elétrons secundários, resultam de alterações eletrosféricas dos átomos da amostra, fornecendo informações acerca da constituição química do material estudado (UL-HAMID, 2018; ZHOU *et al.*, 2006).

2.6.3 Preparo de amostras biológicas para análise por microscopia eletrônica

Os tecidos biológicos têm características particulares que exigem técnicas de preparo especiais, já que sua constituição orgânica, com grande presença de água e superfície

heterogênea são fatores que se não modificados, impossibilitam a formação de uma imagem estável pelo MEV (MEHDIZADEH *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2006).

Amostras biológicas, com sua estrutura superficial heterogênea, e composição orgânica com amplo conteúdo de água são, em geral, frágeis, além de más condutoras de temperatura e de eletricidade. Ao ser atingidas pelo feixe de elétrons, as amostras podem ser diretamente danificadas e ter sua análise distorcida, além desta interação com os elétrons resultar em evaporação de água e formação de gases, que danificam os sensores do microscópio e impossibilitam a avaliação adequada das amostras. Portanto, estas amostras devem ser submetidas a uma série de processos que evitem a sua deterioração pelas reações enzimáticas naturais que ocorrem nestas substâncias, sua degradação pela ação do feixe de elétrons, e a distorção de suas características, de modo a obter-se análises fidedignas. Dessa forma, na análise de material biológico por microscopia eletrônica, são utilizados os seguintes processos: fixação, desidratação e revestimento com substâncias condutoras (BOYDE; MACONNACHIE, 1981; GLAESER, 1971; SCHATTEN, 2011).

A fixação, que pode ser química ou física é necessária para que não haja decomposição do material orgânico pela ação enzimática e para que a amostra, mantenha sua estrutura.

A fixação química consiste na imersão do material estudado em soluções que irão formar ligações com as proteínas da amostra, compondo cadeias que irão inativar quimicamente as moléculas orgânicas. As principais soluções utilizadas são formaldeído, glutaraldeído e tetróxido de ósmio. O glutaraldeído e formaldeído são fixadores não aditivos, ligando-se irreversivelmente a proteínas sem ocasionar sua desnaturação, preservando mais sua estrutura, sendo habitualmente os elementos de escolha para amostras biológicas. O tetróxido de ósmio é habitualmente utilizado como fixador secundário, após a ação dos dois compostos anteriores, uma vez que se fixa melhor a lipídeos, sendo importante para a estabilização das membranas celulares e de amostras ricas deste substrato. Junto aos fixadores químicos são utilizados tampões, habitualmente fosfato de sódio ou cacodilato de sódio, para manter o equilíbrio acidobásico das amostras e também evitar degradação destas (HAYAT, 1986; MIGNEAULT *et al.*, 2004, SCHATTEN, 2011).

A fixação física é habitualmente realizada com congelamento da amostra, e embora seja um processo rápido e que permite manutenção da estrutura morfológica macrocelular,

pode haver maior dano às estruturas intracelulares, devido à formação de cristais de gelo que podem fraturar-se durante manuseio e análise da amostra (SCHATTEN, 2011; UL-HAMID, 2018).

Depois da fixação, há a desidratação e a secagem. Esse processo inicia-se com a substituição da água por um solvente intermediário com menor tensão superficial, para evitar colapso e encolhimento celular com a remoção da água das amostras. Acetona e etanol são os compostos mais utilizados, e este processo de desidratação consiste em imersões que duram de dez até quarenta minutos em soluções gradativamente mais concentradas destes materiais, habitualmente com 50%, 70%, 80%, 90% e 100% de graduação (SCHATTEN, 2011; UL-HAMID, 2018; ZHOU *et al.*, 2006).

A secagem, passo seguinte do processo, no passado era feita deixando-se a amostra para secar em ar ambiente, o que, apesar da menor tensão, causava artefatos na amostra. Atualmente, o método em voga é a secagem a ponto crítico, a qual consiste em substituir, em uma câmara pressórica, o solvente intermediário por dióxido de carbono líquido, que irá, no ponto crítico, passar do estado líquido para o gasoso sem um estado intermediário que causaria a deformação das estruturas devido à tensão superficial, permitindo a observação, com qualidade, de estruturas da ordem de 100 nm (SCHATTEN, 2011; UL-HAMID, 2018; ZHOU *et al.*, 2006).

Por fim, a amostra precisa ser revestida por material condutor, já que a constituição orgânica com baixa densidade atômica não possibilita muitas interações com o feixe de elétrons, além de acumular carga e provocar alterações no campo eletromagnético da câmara. Anteriormente, o revestimento era feito por evaporação de metais na superfície da amostra, o que causava muitos danos à superfície. Atualmente, utiliza-se a pulverização de metais sobre a amostra, com distribuição mais homogênea em sua superfície (SCHATTEN, 2011; UL-HAMID, 2018; ZHOU *et al.*, 2006).

2.6.4 Aplicabilidade do uso microscopia eletrônica nas ciências médicas

O advento da MEV possibilitou avanços na análise de diversos tecidos. As células corpóreas foram melhor definidas morfológicamente, e também, tornou possível observar alterações de vasos sanguíneos e dos diversos parênquimas orgânicos, tanto em situações fisiológicas quanto durante processos inflamatórios, e/ou naqueles decorrentes de intervenções farmacológicas ou cirúrgicas de modo a avaliar precisamente os processos

fisiopatológicos envolvidos e as melhores abordagens diagnósticas e terapêuticas (FLECK;HUMBEL, 2019; SCHATTEN, 2011).

Nos últimos anos, surgiram novos métodos que permitem, com algumas adaptações, a análise por MEV de amostras úmidas. Tal avanço possibilitou melhorias no que tange à observação mais precisa de organelas citoplasmáticas e ao desenvolvimento da engenharia biotecnológica. Estudos demonstram, por exemplo, resultados promissores na interação entre osteoblastos e um polímero utilizado como arcabouço para indução de regeneração óssea, bem como avanços no desenvolvimento de matrizes biológicas para regeneração tecidual (BOGNER *et al.*, 2007; PAWLEY; SCHATTEN, 2007; SCHATTEN, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar, com uso de MEV, os efeitos do uso de diferentes soluções de preservação de enxertos, e de diferentes pressões de distensão intraluminal sobre a anatomia ultraestrutural e a integridade endotelial de segmentos de VSM na CRM.

3.2. Objetivos específicos:

1. Avaliar a anatomia ultraestrutural habitual da VSM com uso da MEV;
2. Avaliar as diferenças na anatomia ultraestrutural da VSM resultantes da preservação desta veia em solução salina ou em solução sanguínea, comparando os achados com uso da MEV;
3. Avaliar as diferenças na anatomia ultraestrutural da VSM resultantes da aplicação de diferentes pressões de distensão intraluminal com uso solução salina ou de solução sanguínea, comparando os achados com uso da MEV.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Universidade Federal do Ceará/PROPESQ) sob o parecer de número 2.257.035 (ANEXO 1). O termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado por todos os pacientes (APÊNDICE 1).

4.1 Desenho do estudo

O estudo foi do tipo prospectivo, longitudinal, experimental, controlado e comparativo *ex-vivo*.

4.2 Local da pesquisa

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Hospital São Raimundo e no Hospital Regional da Unimed, em Fortaleza, Ceará. As análises por MEV foram realizadas na Central Analítica da Universidade Federal do Ceará.

4.3 Amostra

Doze pacientes submetidos pela mesma equipe cirúrgica à CRM com uso de enxertos venosos de VSM, no período de abril de 2019 a fevereiro de 2020, que concordaram com a participação no estudo.

4.3.1 Critérios de inclusão de participantes

Pacientes de ambos os sexos não-diabéticos, com idade entre 50 e 80 anos, e sem doença venosa crônica conhecida, com indicação cirúrgica de CRM eletiva, com programação pré-operatória para uso de enxertos de VSM. Para ser analisada a VSM destes pacientes, em avaliações por ultrassonografia pré-operatória e por visualização direta intraoperatória, deveria demonstrar ausência de varicosidades, de refluxo, bem como ausência de traumas relacionados à exérese cirúrgica.

4.3.2 Critérios de exclusão de participantes

Pacientes que se recusarem a permanecer no estudo em quaisquer de suas etapas.

4.4 Protocolo do estudo

4.4.1 Procedimento Cirúrgico para obtenção dos enxertos

Após monitorização eletrocardiográfica e invasiva da pressão arterial, bem como

oximetria de pulso, o paciente é submetido a anestesia geral balanceada. A seguir são realizadas inserções de sonda vesical de demora e cateter venoso central.

O mesmo profissional realiza então a dissecação da VSM no membro inferior no qual a ultrassonografia com Doppler realizada no pré-operatório ilustra melhores características, por meio de incisões escalonadas, com técnica atraumática e com mínima dilatação durante o preparo (HWANG *et al.*, 2010). O segmento venoso foi excisado no mínimo da coxa até o nível da articulação fêmoro-tibial, ou até um nível mais distal na perna a depender do número de artérias coronárias a serem revascularizadas.

Após mensuração do comprimento do segmento venoso a ser utilizado como enxerto para revascularização miocárdica, avalia-se a presença de segmento excedente de pelo menos três centímetros desta VSM. Obtendo-se esse segmento, a equipe cirúrgica entrega este material para examinador que, em campo cirúrgico estéril, na sala cirúrgica realiza os procedimentos necessários para preparo do enxerto para avaliação por MEV.

4.4.2 Randomização e alocação nos grupos de estudo

Previamente a cada procedimento, randomizou-se para quais grupos seriam alocados os segmentos de VSM a serem obtidos de cada paciente. Os segmentos venosos excisados foram alocados em sete grupos de estudo, com os respectivos procedimentos de preparo e fixação, descritos a seguir. Cada grupo foi constituído de seis segmentos venosos de pacientes distintos, de modo a se ter mais segurança na análise dos achados.

4.4.3 Preparo dos segmentos venosos

Imediatamente após sua exérese, os segmentos venosos foram lavados com soro fisiológico para remoção de detritos e hemácias. Os procedimentos seguintes dependem do grupo em que os segmentos venosos foram alocados. As soluções foram utilizadas em temperatura ambiente.

Segmentos de VSM do **grupo 1 (controle)** foram, logo após exérese, imediatamente conservados em tubo de ensaio contendo solução de fixação com 4% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído e tampão cacodilato de sódio 0,1 M.

Segmentos de safena do **grupo 2 (SAH 30)** foram conservados em solução de SAH e distendidos, com uso de seringa manometrada, a uma **pressão constante de 30 mmHg**

durante **5 minutos**. Após isto, foram distendidos por **15 minutos** em solução de fixação e, imediatamente após este processo, conservados em tubo de ensaio contendo esta mesma solução.

Segmentos venosos do **grupo 3 (SF 30)** foram conservados em SF e distendidos a uma **pressão constante de 30 mmHg** durante **5 minutos**. Após isto, foram distendidos por **15 minutos** na solução de fixação e, imediatamente após esse processo, conservados em tubo de ensaio contendo esta mesma solução.

Segmentos venosos do **grupo 4 (SAH 100)** foram conservados em solução de SAH e distendidos a uma **pressão constante de 100 mmHg** durante **5 minutos**. Após isto, foram distendidos por **15 minutos** na solução de fixação e, imediatamente após esse processo, conservados em tubo de ensaio contendo esta mesma solução.

Segmentos venosos do **grupo 5 (SF 100)** foram conservados em solução de SF e distendidos a uma **pressão constante de 100 mmHg** durante **5 minutos**. Após isto, foram distendidos por **15 minutos** na solução de fixação e, imediatamente após esse processo, conservados em tubo de ensaio contendo esta mesma solução.

Segmentos venosos do **grupo 6 (SAH 300)** foram conservados em solução de SAH e distendidos a uma **pressão constante de 300 mmHg** durante **5 minutos**. Após isto, foram distendidos por **15 minutos** na solução de fixação e, imediatamente após esse processo, conservados em tubo de ensaio contendo esta mesma solução.

Segmentos venosos do **grupo 7 (SF 300)** foram conservados em solução de SF e distendidos a uma **pressão constante de 300 mmHg** durante **5 minutos**. Após isto, foram distendidos por **15 minutos** na solução de fixação e, imediatamente após esse processo, conservados em tubo de ensaio contendo esta mesma solução.

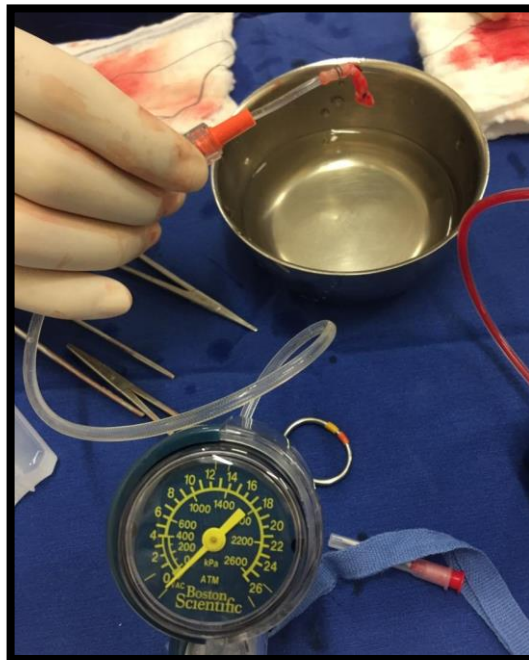
A FIGURA 1 ilustra o aspecto de segmentos de VSM logo após exérese cirúrgica e canulação. A FIGURA 2, por sua vez, ilustra a metodologia de distensão, sob pressão controlada, dos segmentos de VSM.

FIGURA 1 - Segmento de VSM seccionado e canulado para infusão da solução de preservação e aplicação da pressão de distensão



Fonte: Obtida pelo autor.

FIGURA 2 - Segmento de VSM distendido sob pressão controlada com uso de seringa manometrada



Fonte: Obtida pelo autor

4.4.4 Conservação e transporte

Ao término destes procedimentos, os tubos de ensaio contendo segmentos de VSM foram mantidos em recipiente isotérmico, e conservados em resfriamento controlado (± 10 °C) até seu transporte à Central Analítica da Universidade Federal do Ceará, onde seriam realizados os procedimentos seguintes para processamento e posterior análise por microscopia eletrônica dos segmentos venosos.

4.4.5 Preparo das amostras para análise por MEV

As amostras entregues em solução de fixação padrão contendo 4% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído e tampão cacodilato de sódio 0,1 M, são então retiradas de seu recipiente, e então lavadas com a solução tampão por três vezes.

A etapa seguinte consiste na desidratação das amostras, que ocorre com sua imersão em soluções com concentração crescente de etanol, a saber, 50%, 70%, 90% e 100%. Os segmentos de VSM permanecem em cada uma destas concentrações por quarenta minutos, sendo repetida a desidratação na solução de etanol a 100% por mais duas vezes.

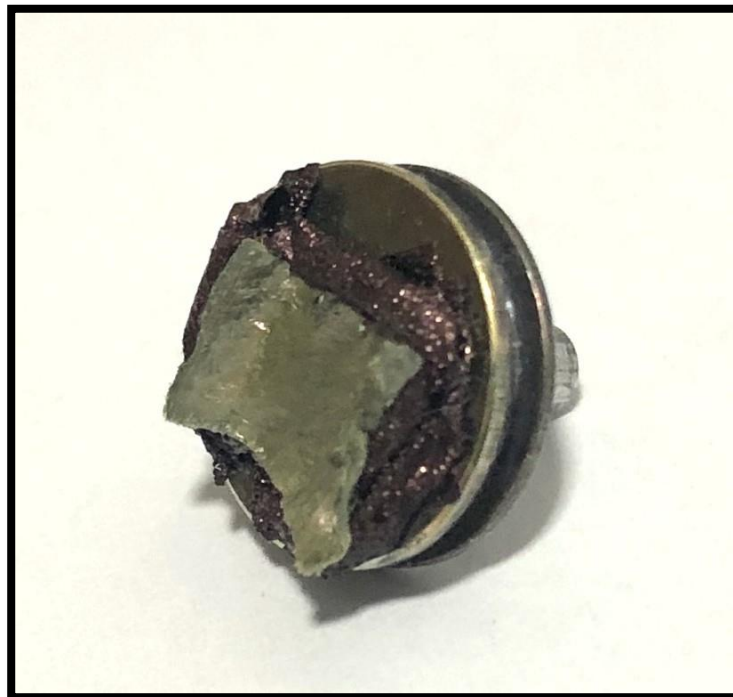
Uma vez desidratadas, as amostras foram submetidas a secagem, para remoção da umidade e de solventes residuais, por técnica de ponto crítico de dióxido de carbono (CO₂), com uso do equipamento K850 Critical Point Drier. Nesta técnica, a amostra já fixada e desidratada, é colocada imersa em acetona em uma câmara com temperatura controlada a 4-5°C. Injeta-se então CO₂ líquido e lentamente aquece-se a câmara de modo que este composto se torne gasoso, com sua expansão resultando em aumento da pressão na câmara igualando a densidade da fase líquida à da fase gasosa, zerando a tensão superficial e evitando que esta força altere a forma da amostra.

Amostras de VSM secas foram então montadas no suporte porta-amostras do MEV, chamado “*stub*”, com uso de fita adesiva de carbono (FIGURA 3). Uma vez que tanto os espécimes, quanto a fita adesiva são isolantes elétricos e térmicos, é necessário aumentar sua condutividade para permitir a produção de elétrons secundários que formarão a imagem do microscópio eletrônico, bem como para reduzir o risco de aquecimento pelo feixe elétrons do MEV, o que resultaria em destruição da amostra. Dessa forma, procedeu-se à cobertura metálica das amostras com uma camada de 20-30 nm de ouro pela técnica de “*sputtering*”, na

qual um eletrodo maciço com ouro é bombardeado por íons positivos, fazendo com que este material se deposite na superfície da amostra.

Os *stubs* com as amostras devidamente metalizadas foram armazenados em dissecador contendo sílica gel até sua análise microscópica.

FIGURA 3 – Aspecto de segmento de VSM já submetido a processamento e montado em *stub* para análise por MEV



Fonte: Obtida pelo autor

4.4.6 Análise por MEV

O estudo dos segmentos de VSM por MEV foi feito em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450 FEG – FEI. Os *stubs* contendo as amostras a serem estudadas foram alocados no porta-amostras do equipamento, e então selados. As amostras são então posicionadas a 10 mm da lente objetiva do MEV e câmara é então colocada em condição de vácuo. Após isto, definiu-se um aumento de cinquenta vezes de magnificação, e ligou-se o

feixe de elétrons do microscópio com uma voltagem de 10,0 kV para aceleração do feixe de elétrons. Com isto, imagens foram formadas e selecionou-se qual amostra a ser estudada.

Em cada amostra foi selecionada uma área central, de 0,5 cm x 0,5 cm, a ser estudada para analisar os efeitos das diferentes técnicas de preparo da VSM sobre o endotélio venoso. Desta área central, magnificações crescentes foram empregadas para avaliação minuciosa da estrutura do tecido.

Um avaliador do grupo de pesquisa deste estudo, com experiência na análise de tecidos biológicos por MEV, avaliou cada segmento de VSM, sem o conhecimento de qual grupo de estudo este fora incluído. Foram avaliados o aspecto habitual do endotélio e da camada íntima dos segmentos de VSM e os seguintes parâmetros: separação de células endoteliais; perda de células endoteliais; exposição da membrana basal; exposição de colágeno fibrilar; e, por fim, presença de fraturas e fissuras na camada íntima.

Estes aspectos foram graduados utilizando uma adaptação do escore proposto por Gundry *et al.*, (1980) graduando-se objetivamente estes parâmetros de 0 a 4. 0 indica ausência de alterações; 1 indica alterações em até 10% da amostra; 2 indica alterações de 10 a 25 % da amostra; 3 indica alterações em 25 a 50% da amostra; e 4 indica alterações em mais de 50% da amostra. Ao fim, soma-se os escores obtidos de todos os parâmetros para cada segmento estudado em determinado grupo, obtendo-se dessa forma, um escore de dano tecidual global uma média de pontuação para cada grupo e avaliando o grau de lesão global ao tecido.

Após análise, a pontuação de cada um desses critérios foi somada, gerando um escore total, podendo variar de 0 (zero) até vinte, e que, quanto maior, indicaria maior dano da amostra estudada.

O mesmo avaliador examinou a presença de artefatos nas amostras, ou seja, elementos não pertencentes ao endotélio ou ao tecido celular, mas que se depositam sobre a VSM em decorrência dos processos de fixação e preparação para análise por MEV. Estes artefatos foram identificados e não influíram no escore de dano endotelial da VSM. Ao término da avaliação das amostras, retornou-se à magnificação para cinquenta vezes, desligou-se o feixe de elétrons e, após cinco minutos, desligou-se também a bomba de vácuo, com remoção das amostras e acondicionamento delas ao dissecador.

Os dados de cada um dos seis segmentos venosos de cada um dos sete grupos de estudos foram então tabelados para análise estatística.

4.5 Análise estatística

A medida do dano estrutural global em segmentos de VSM, por se tratar de um somatório de escores, foi considerado uma variável quantitativa, de modo que foi inicialmente analisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Como tal requisito foi constatado, então, para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio padrão (DP), bem como foram empregados métodos paramétricos para a estatística analítica. Assim, comparações entre os sete grupos de tratamento em relação a essa variável foram realizadas mediante o uso da análise de variância para um fator de classificação, associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares.

Ademais, considerando apenas os segmentos de VSM expostos às soluções de preservação e submetidos às pressões de distensão, um modelo de análise de variância para dois fatores de classificação foi usado para avaliar os efeitos dos meios de preservação (fator 1: SF e SAH) e das diferentes intensidades de pressões de distensão (fator 2: 30, 100 e 300 mmHg) no grau de dano estrutural global dos segmentos de VSM, sendo complementada pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni, para verificar diferenças entre os dois meios de preservação para cada pressão de distensão, bem como entre as três pressões de distensão para cada meio de preservação.

Os parâmetros que compõem o escore global de avaliação do dano estrutural de segmentos de VSM, isto é, grau de separação de células endoteliais, grau de perda de células endoteliais, grau de exposição da membrana basal, grau de exposição de colágeno fibrilar e presença de fissuras na camada íntima, por se tratarem de variáveis ordinais, foram expressas como mediana, percentil 25 e percentil 75 (intervalo interquartil) e valores mínimo e máximo e analisadas por métodos não paramétricos. Assim, para comparar os sete grupos de tratamento em relação a tais variáveis, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunnet, para verificar diferenças entre os grupos aos pares.

Em todas as análises, empregaram-se testes bicaudais, estabelecendo-se o nível de significância em 0,05 (5%), considerando-se, por conseguinte, como estatisticamente

significante um valor P menor que 0,05. Os softwares GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software, SanDiego, California, USA) e IBM SPSS Statistics versão 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) foram utilizados para a realização dos procedimentos estatísticos. O primeiro software também foi usado para a elaboração dos gráficos.

5 RESULTADOS

Do período de abril de 2019 a fevereiro de 2020, doze pacientes foram alocados neste estudo prospectivo. Os dados demográficos e variáveis pré-operatórias estão descritas na TABELA 1.

TABELA 1. Dados demográficos e características clínicas pré-operatórias dos doze pacientes estudados.

Variável	N
Idade (anos) (média ± desvio padrão)	67,67 ± 5,54
Idade > 75 anos	1 (8,3%)
Sexo feminino	2 (16,6%)
Sexo masculino	10 (83,4%)
IAM prévio	1 (8,3%)
Classe Funcional III/IV (NYHA)	0
IMC (média ± desvio padrão)	26,83 ± 3,43
História de tabagismo	6 (50%)
DPOC	1 (8,33%)
Diabetes	0
Insuficiência Renal	0
Dislipidemia	12 (100%)
Hipertensão Arterial Sistêmica	11 (91,6%)
Lesão de tronco da ACE	2 (16,6%)
Doença de dois vasos	2 (16,6%)
Doença de três vasos	8 (66,6%)
FE ≤ 35%	0
Doença cerebrovascular	1 (8,33%)
Doença carotídea (lesão ≥ 60%)	0
Euroscore II (média ± desvio padrão)	1,03 ± 0,52

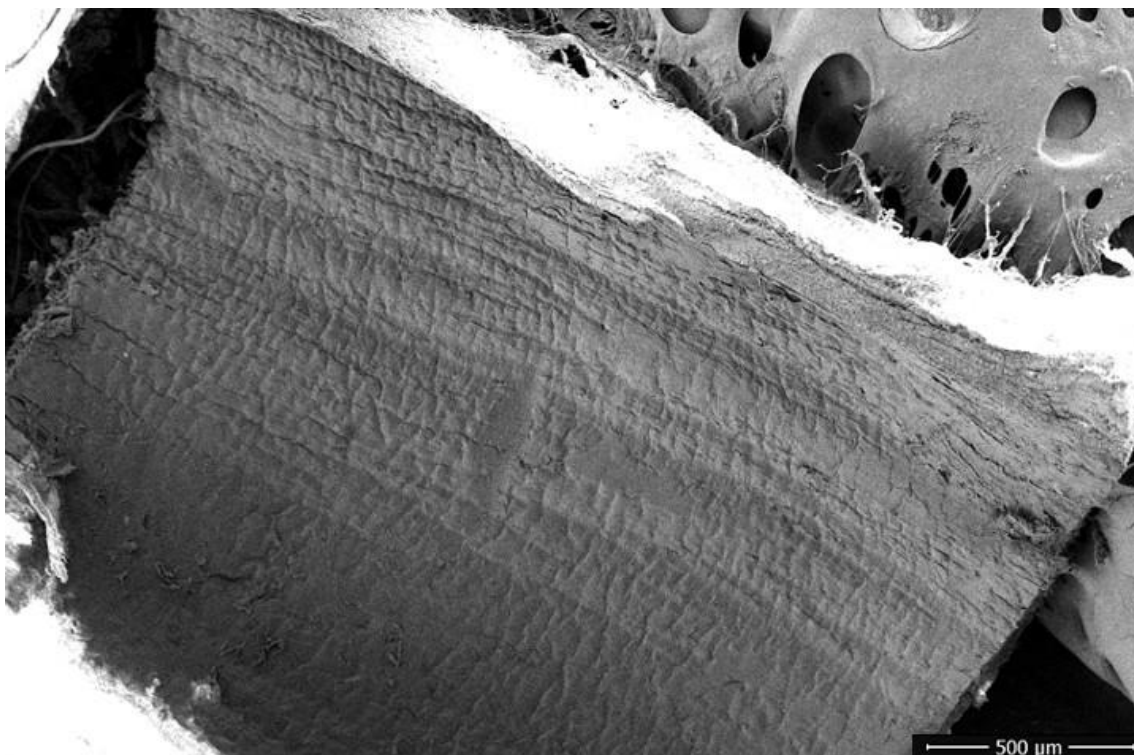
IAM: infarto agudo do miocárdio; NYHA: New York Heart Association; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; EuroScore: European System for Cardiac Operative Risk Evaluation

5.1 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA VEIA SAFENA MAGNA

5.1.1 GRUPO 1

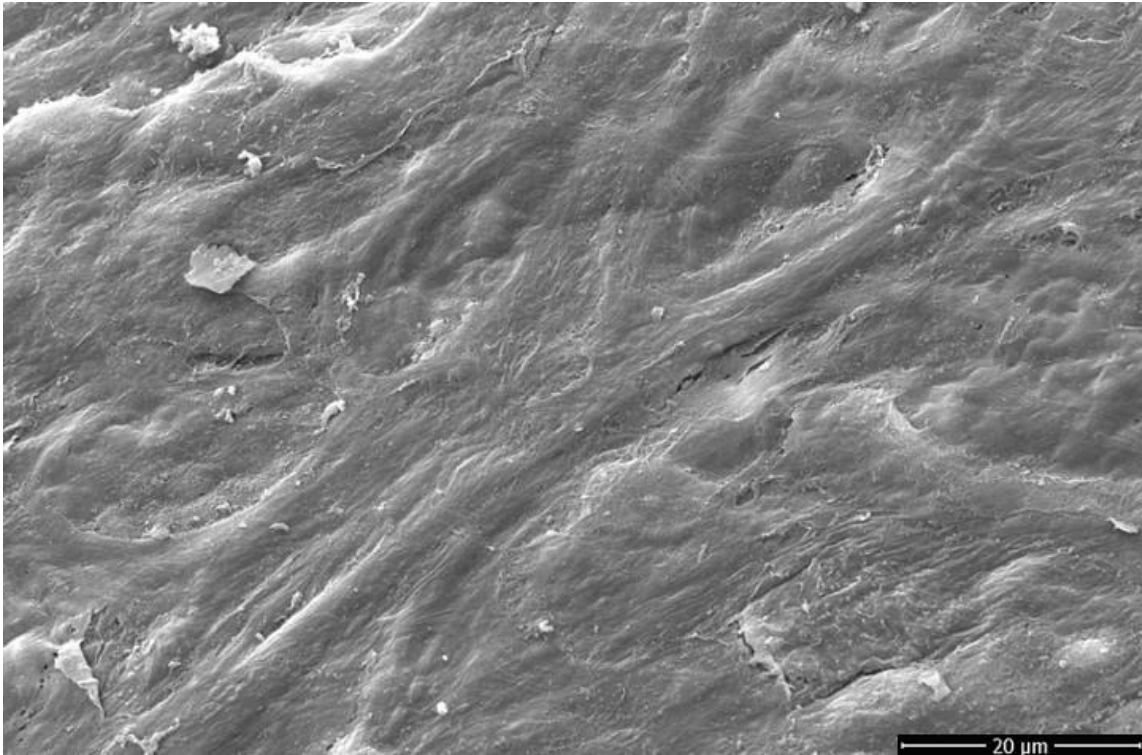
Segmentos de VSM do Grupo Controle, que foram analisados logo após exérese cirúrgica, sem influência das metodologias de preparo da VSM para a CRM. Notou-se, em quatro das seis amostras estudadas, total integridade da camada íntima venosa, sem sinais de dano endotelial. Em duas amostras, no entanto, ocasional separação de células endoteliais, foi visualizada, com este achado ocorrendo em área menor que 10% das respectivas amostras analisadas. A FIGURA 4 e a FIGURA 5 representam os aspectos mais relevantes deste grupo, na análise por MEV. O escore médio de dano tecidual global deste grupo foi de $0,33 \pm 0,51$.

FIGURA 4 – Aspecto, em MEV com magnificação de 150 vezes, da camada íntima de segmento de VSM analisado logo após exérese cirúrgica (Grupo controle).



Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 150 vezes. Nota-se a integridade da camada íntima, sem sinais de dano celular.

FIGURA 5 – Aspecto, em MEV com magnificação de 4319 vezes, da camada íntima de segmento de VSM analisado logo após exérese cirúrgica (Grupo Controle).

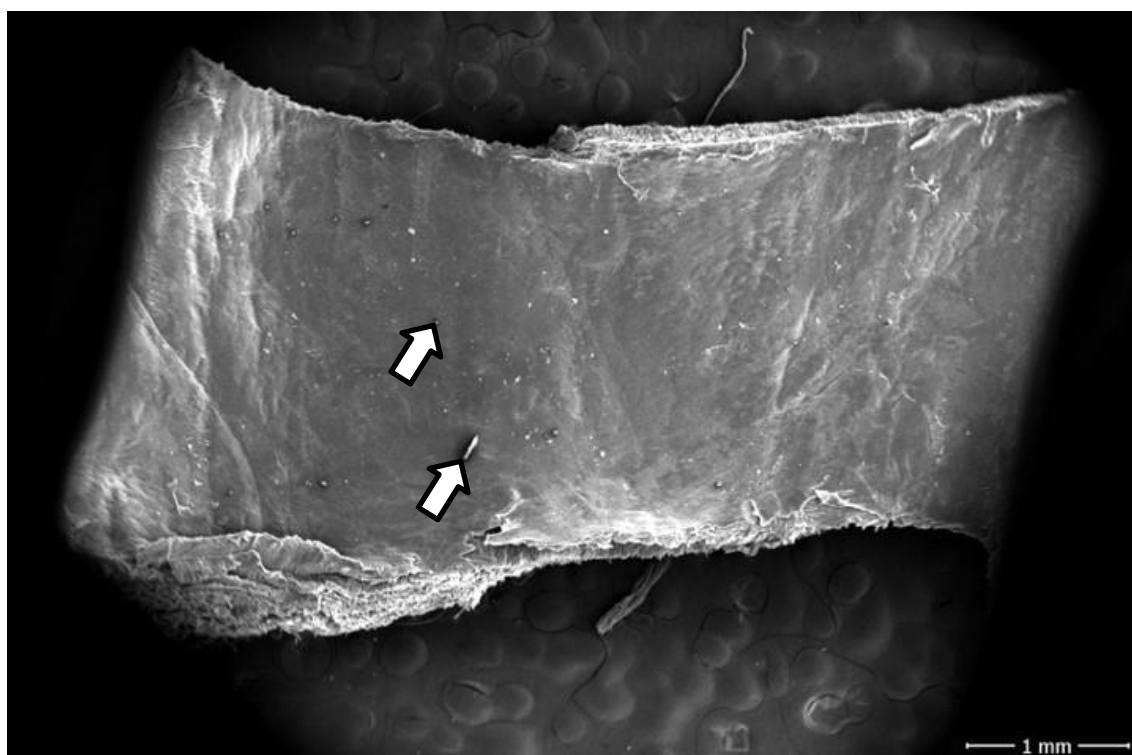


Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 4319 vezes. Nota-se integridade das células endoteliais, sem exposição de membrana basal e/ou de fibras colágenas.

5.1.2 GRUPO 2

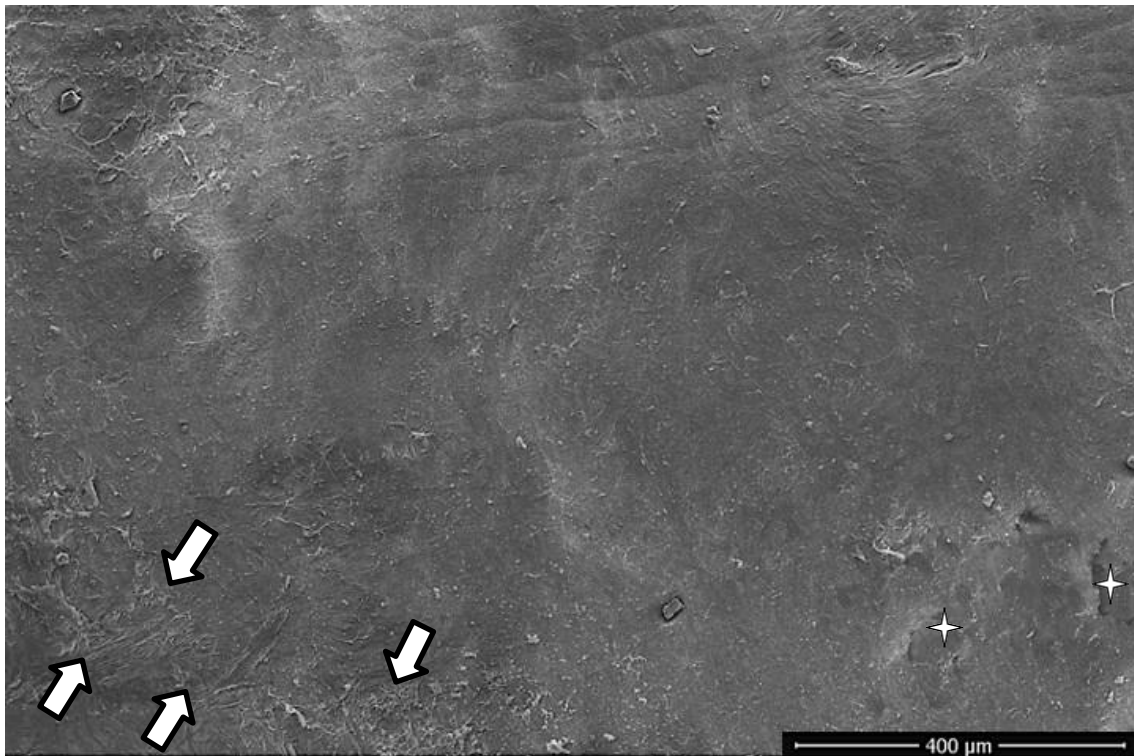
Segmentos de VSM do Grupo SAH 30, por sua vez, apresentaram alterações na superfície endotelial, sobretudo com eventual separação e/ou perda de células endoteliais, e ocasional exposição de membrana basal. Não se houve exposição de fibras colágenas ou fissuras na camada íntima dos segmentos estudados neste grupo. A FIGURA 6, a FIGURA 7, e a FIGURA 8 representam os aspectos mais relevantes deste grupo, na análise por MEV. O escore médio de dano deste grupo foi de $3,5 \pm 1,37$

FIGURA 6 – Aspecto, em MEV com magnificação de 59 vezes, de segmento de VSM preservado em SAH e distendido com pressão de 30 mmHg (Grupo SAH 30).



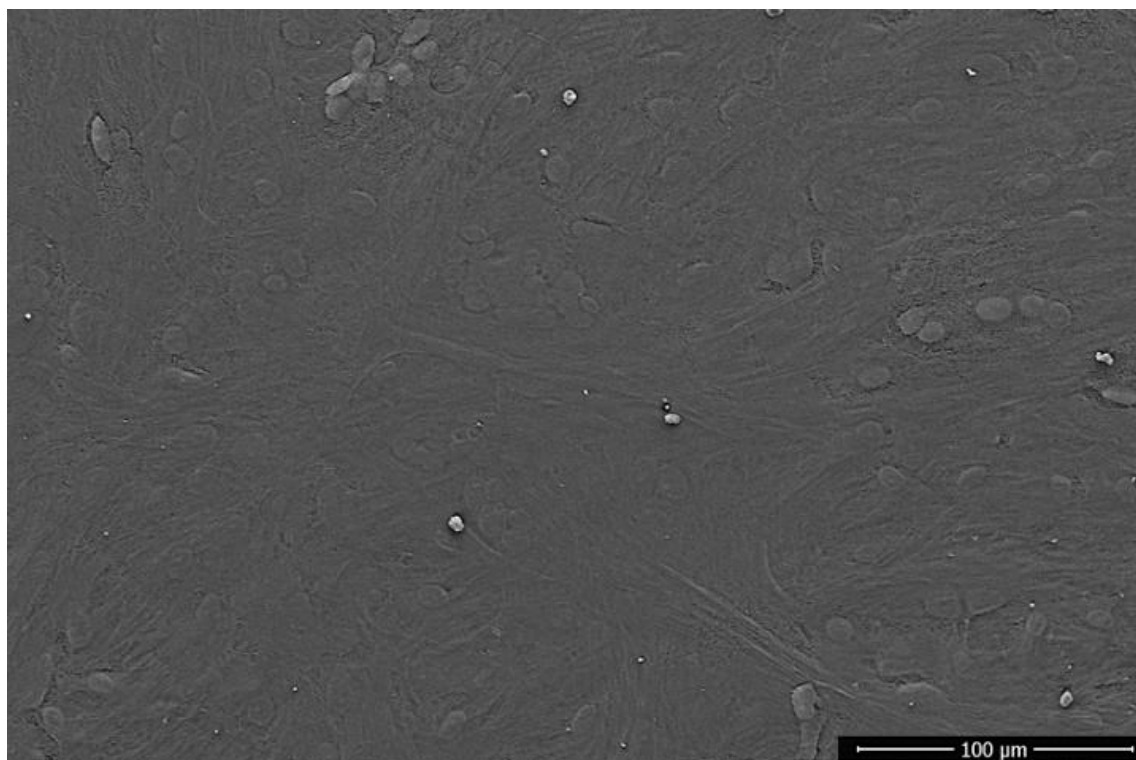
Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 59 vezes. Nota-se a integridade geral do endotélio, com discretos artefatos do preparo para análise microscópica na camada íntima (seta).

FIGURA 7 – Aspecto, em MEV com magnificação de trezentas vezes, de segmento de VSM preservado em SAH e distendido com pressão de 30 mmHg (Grupo SAH 30).



Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 300 vezes. Nota-se a preservação da arquitetura endotelial da amostra, com eventual separação de células endoteliais (setas) e exposição de membrana basal (estrela).

FIGURA 8 – Aspecto, em MEV com magnificação de mil vezes, de segmento de VSM preservado em SAH e distendido com pressão de 30 mmHg (Grupo SAH 30).

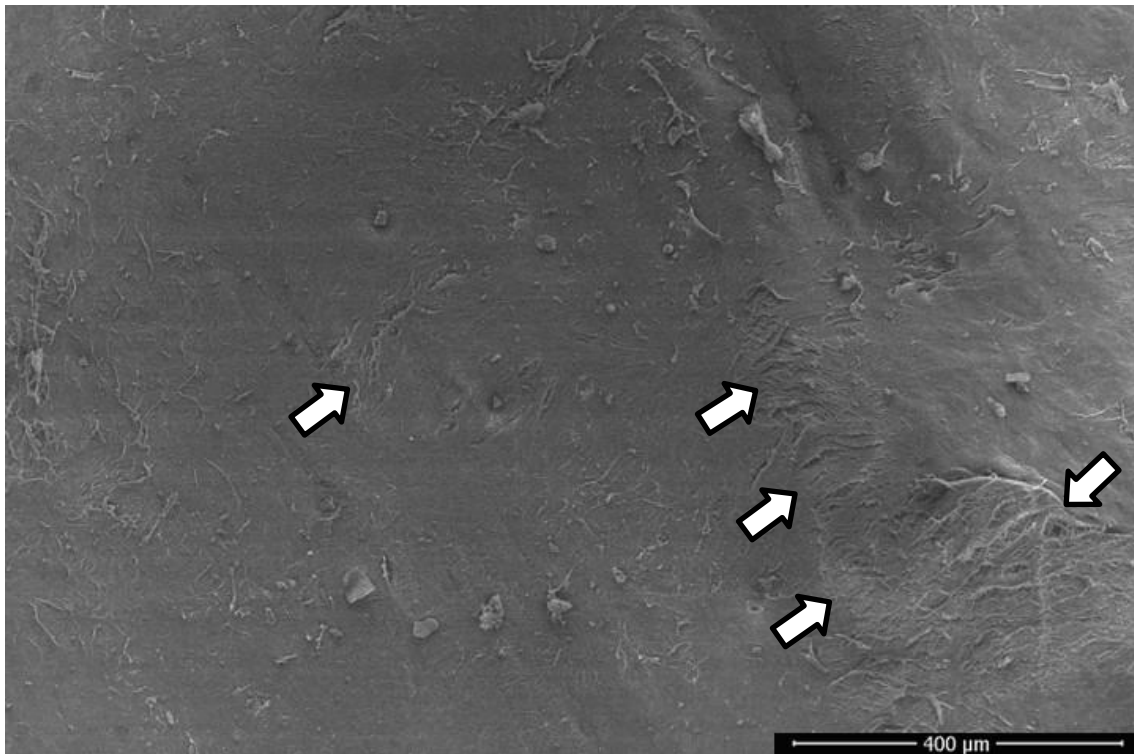


Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 1000 vezes. Nota-se o aspecto do endotélio íntegro na análise microscópica.

5.1.3 GRUPO 3

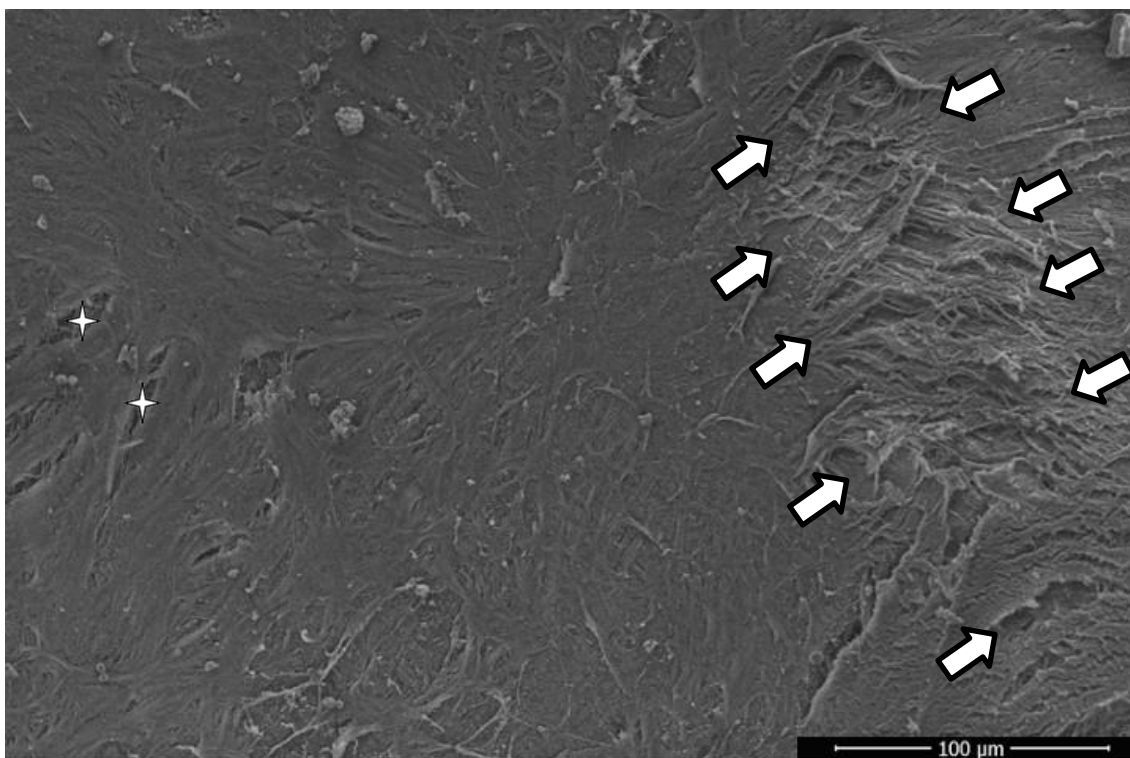
Segmentos do Grupo SF 30 apresentaram maiores alterações na camada íntima em comparação aos grupos 1 e 2. Houve maior grau de separação e perda de células endoteliais, com perda do padrão uniforme de distribuição endotelial, com maior perda e separação celular, presença de fissuras na camada íntima e exposição de fibras colágenas (FIGURA 9 e FIGURA 10). Com maior magnificação nota-se a separação celular, com presença de aglomerados plaquetários (FIGURA 11), e inclusive trombo em formação (FIGURA 12). O escore médio de dano deste grupo foi de $9,33 \pm 1,96$.

FIGURA 9 – Aspecto, em MEV com baixa magnificação, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 30 mmHg (Grupo SF 30).



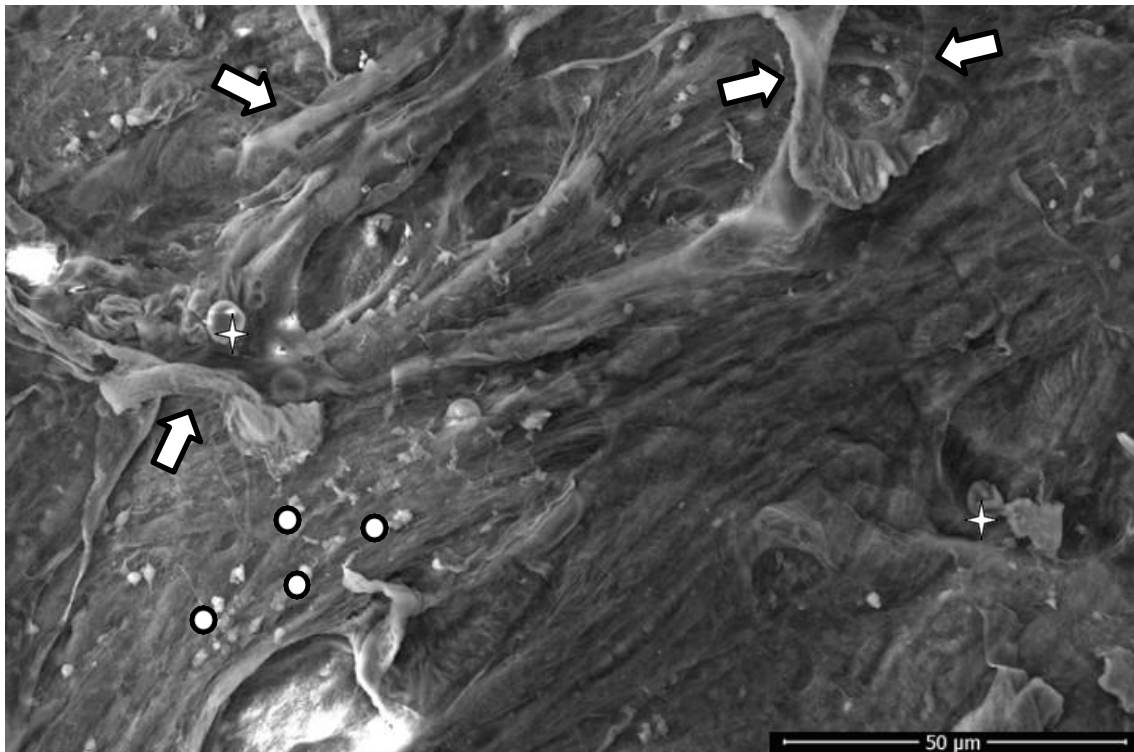
Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 300 vezes. Nota-se extensa área com perda de células endoteliais, com associada separação celular e formação de fissuras na camada íntima (setas).

FIGURA 10 – Aspecto, em MEV com magnificação de mil vezes, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 30 mmHg (Grupo SF 30).



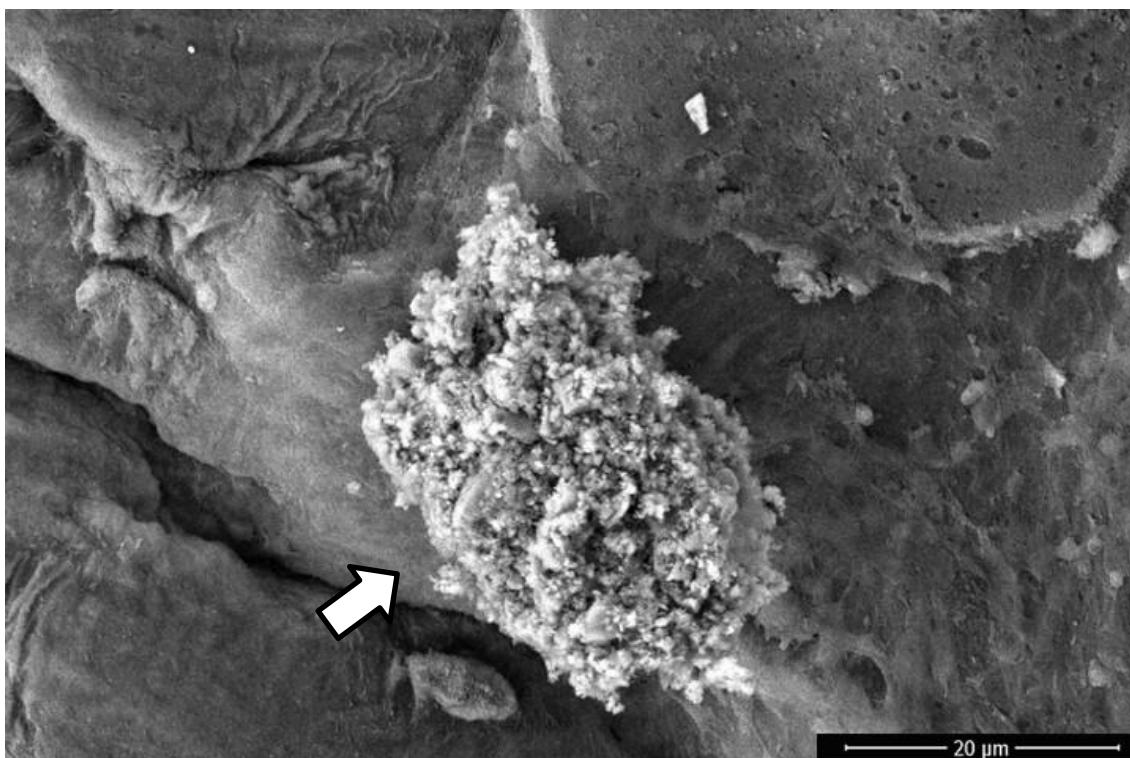
Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 1000 vezes. Nota-se importante separação de células endoteliais com exposição de membrana basal e fibras colágenas (seta), além de fissuras na camada íntima celular (estrela)

FIGURA 11 – Aspecto, em MEV com magnificação de 2500 vezes, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 30 mmHg (Grupo SF 30).



Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 2500 vezes. Nota-se em maior detalhe o aspecto da separação endotelial (seta), além da presença de hemácias (estrela) e de pequenos aglomerados plaquetários (círculos).

FIGURA 12 – Aspecto, em MEV com magnificação de 5000 vezes, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 30 mmHg (Grupo SF 30).

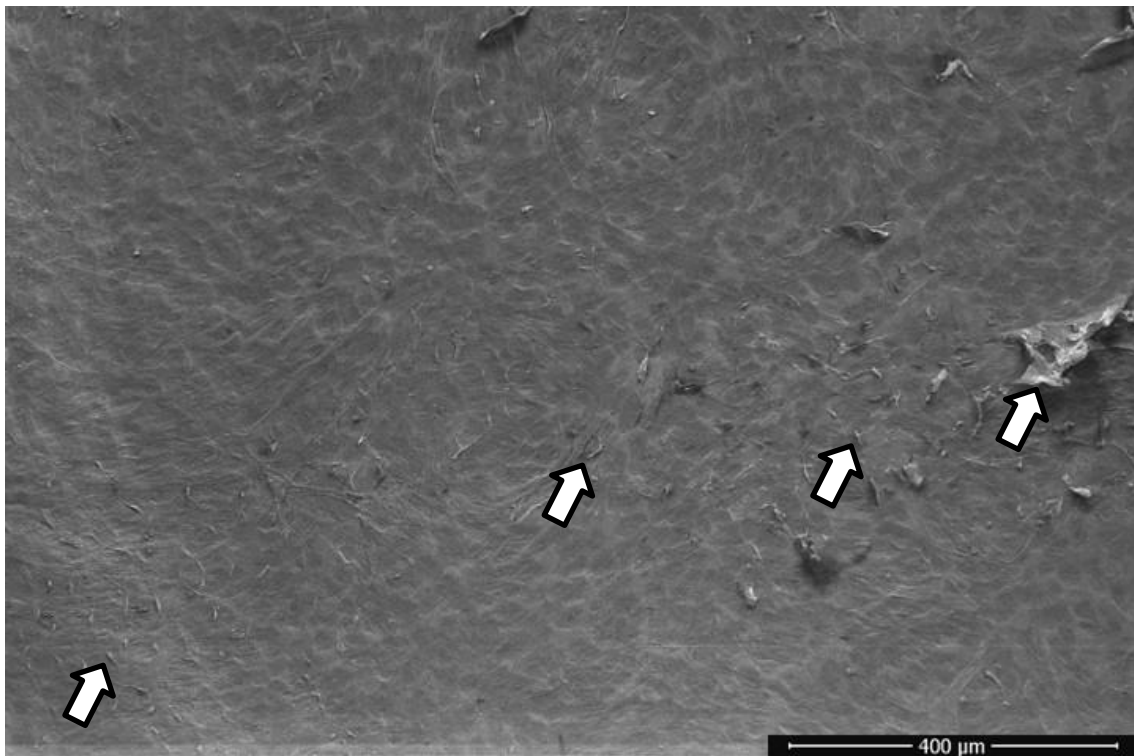


Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 5000 vezes.
Nota-se presença de aglomerado de fibrina e de plaquetas na superfície endotelial (seta).

5.1.4 GRUPO 4

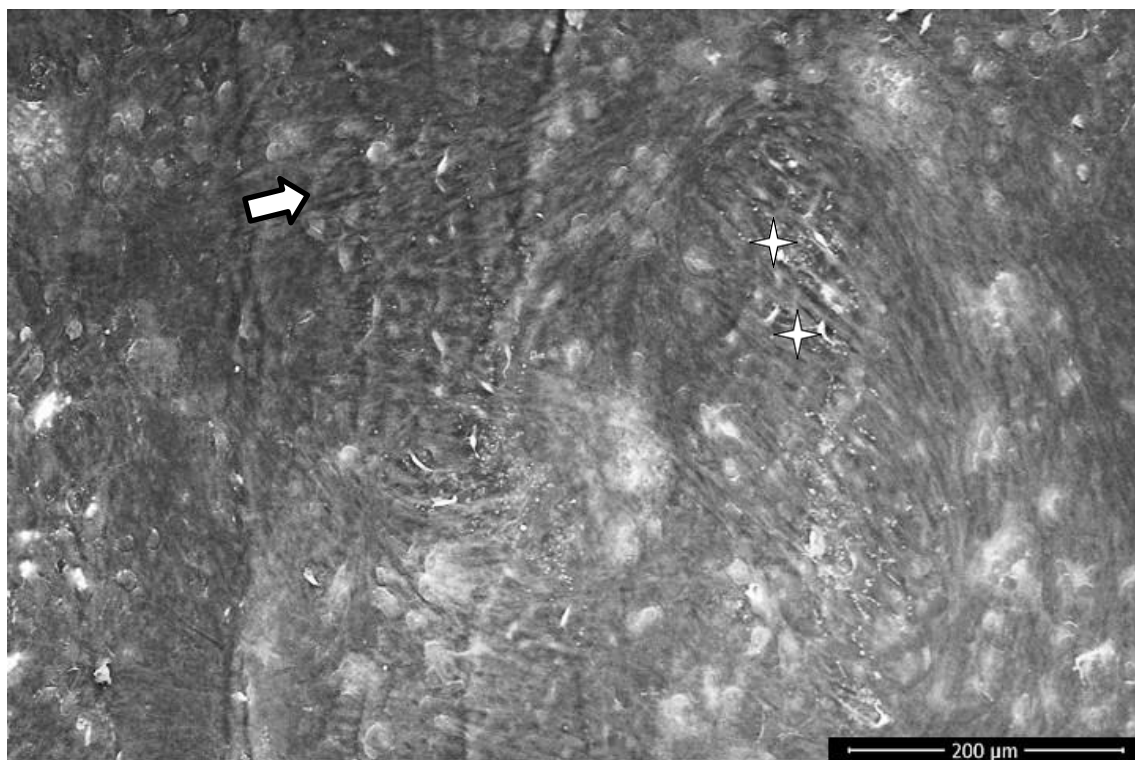
Segmentos de VSM do Grupo SAH 100, submetidos a pressão de distensão de 100 mmHg apresentaram notadamente maior separação de células endoteliais e exposição de membrana basal em relação ao Grupo SAH 30, mas mantiveram-se com rara ou ausente exposição de fibras colágenas, mantendo, em geral, a estrutura da camada íntima. A FIGURA 13, FIGURA 14 e FIGURA 15, ilustram os achados mais relevantes na análise por MEV. O escore médio de dano deste grupo foi de $8,33 \pm 1,50$

FIGURA 13 – Aspecto, em MEV com magnificação de trezentas vezes, de segmento de VSM preservado em SAH e distendido com pressão de 100 mmHg (Grupo SAH 100).



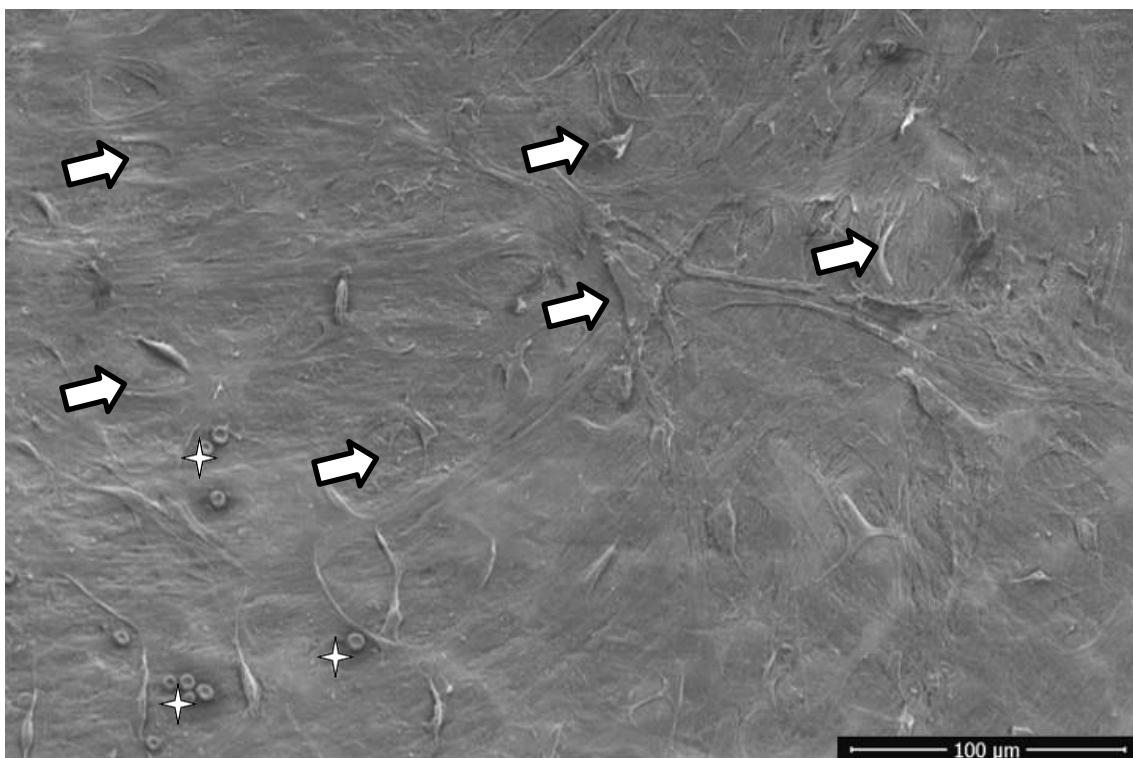
Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 300 vezes. Nota-se preservação da maior parte da camada íntima, com apenas ocasional separação e/ou perda de células endoteliais (seta).

FIGURA 14 – Aspecto, em MEV com magnificação de quinhentas vezes, de segmento de VSM preservado em SAH e distendido com pressão de 100 mmHg (Grupo SAH 100).



Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 500 vezes. Nota-se áreas de separação celular, (seta) e esparsas fissuras na camada íntima (estrela).

FIGURA 15 – Aspecto, em MEV com magnificação, de segmento de VSM preservado em SAH e distendido com pressão de 100 mmHg (Grupo SAH 100).

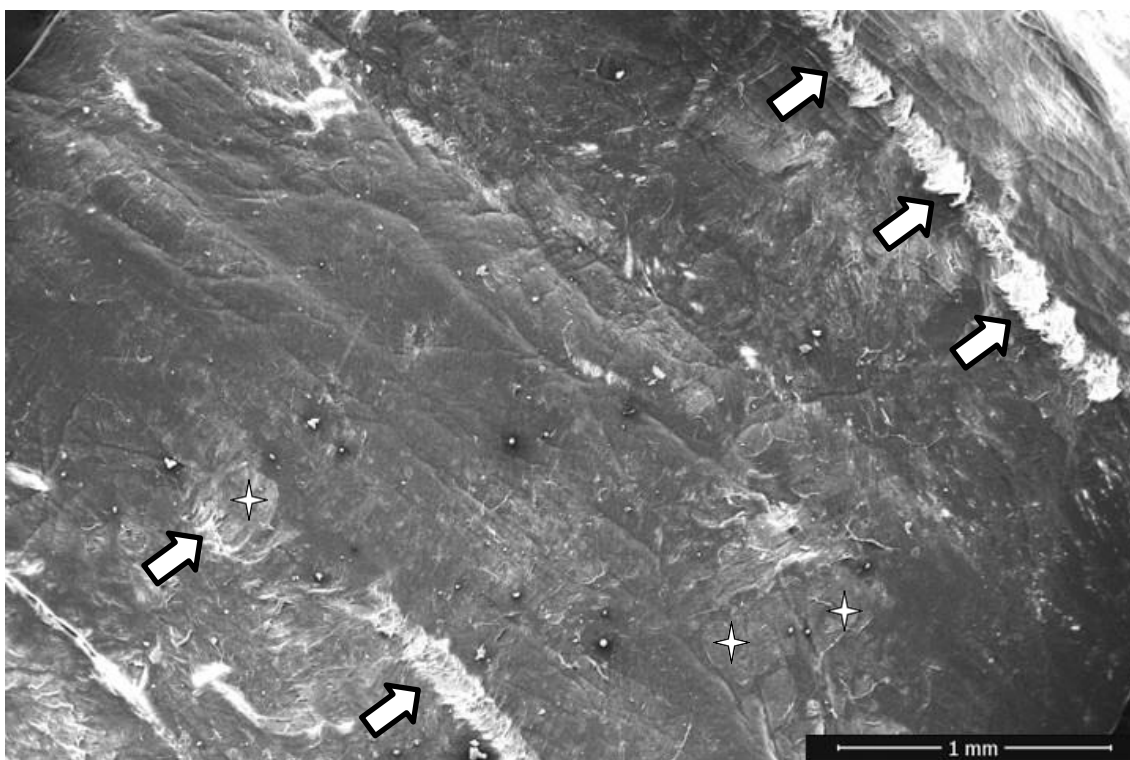


Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 1000 vezes. Nota-se separação de células endoteliais, com exposição de membrana basal (seta) e presença de ocasionais hemácias (estrela).

5.1.5 GRUPO 5

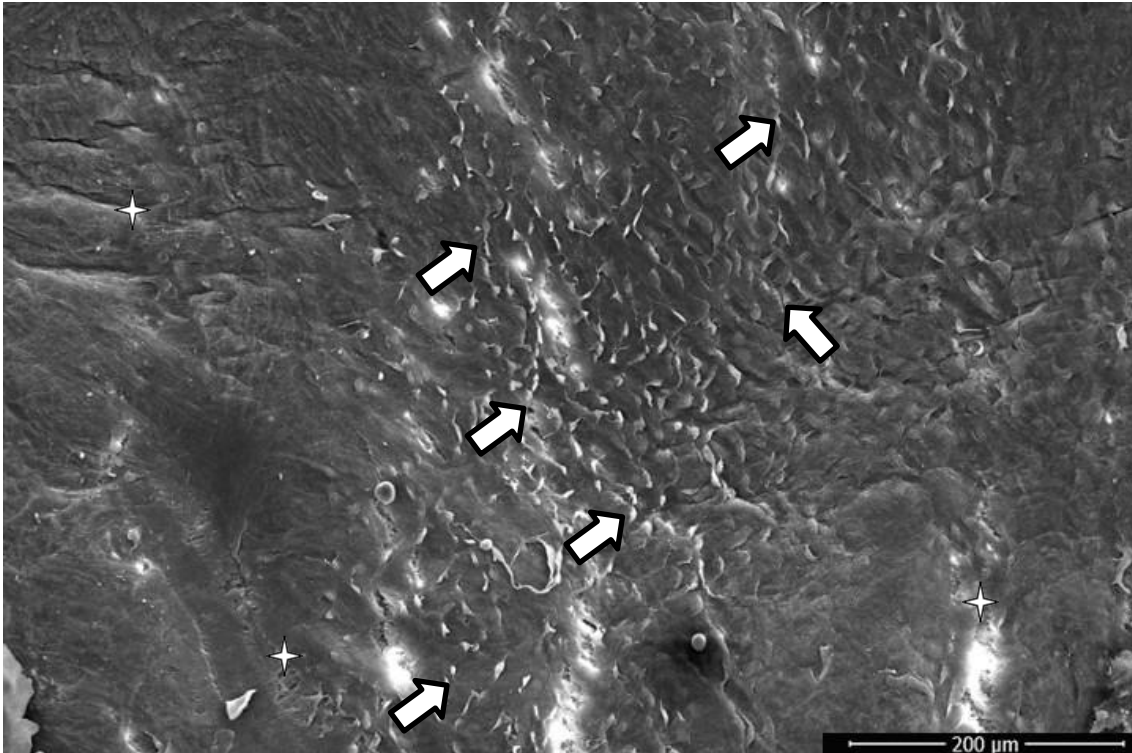
Segmentos venosos do Grupo SF 100 apresentaram características mais marcantes na análise por MEV. Houve considerável aumento nas áreas com perda de células endoteliais, com exposição frequente da matriz colágena e presença de fissuras na camada íntima (FIGURA 16). Em alguns segmentos venosos, notou-se também padrão de alongamento das células endoteliais (FIGURA 17, FIGURA 18 e FIGURA 19). O escore médio de dano deste grupo foi de $12,16 \pm 1,72$.

FIGURA 16 – Aspecto, em MEV com magnificação de cem vezes, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 100 mmHg (Grupo SF 100).



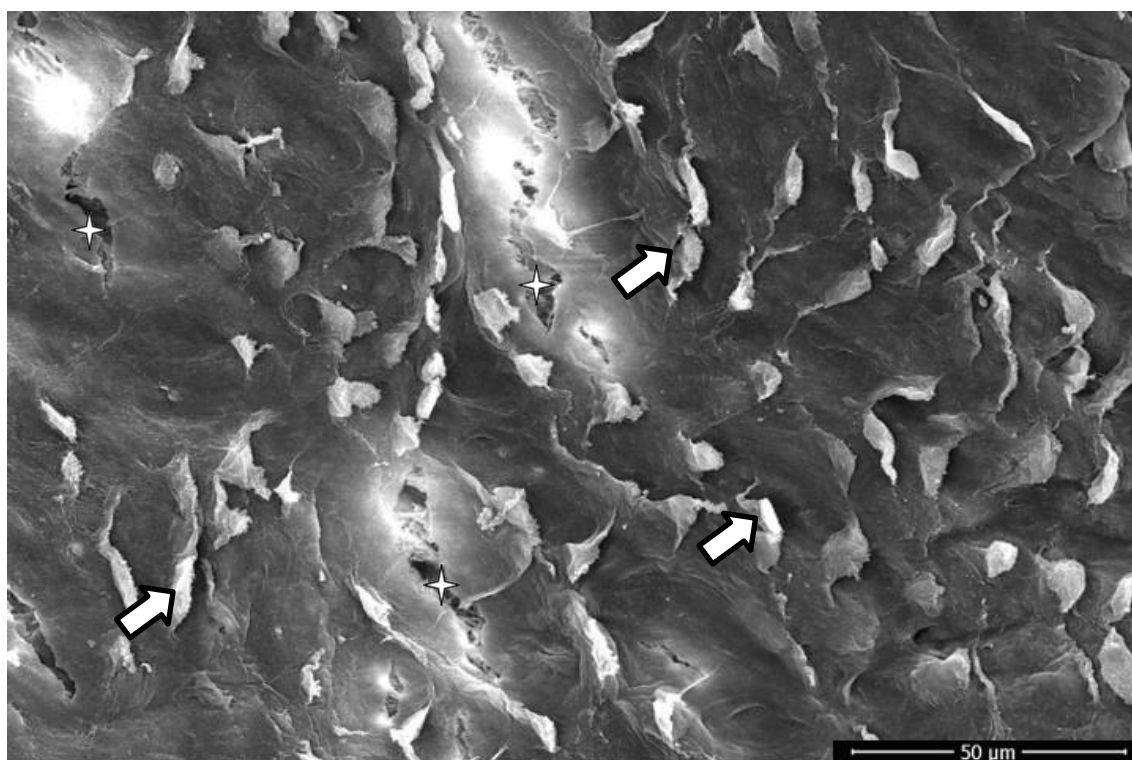
Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 100 vezes. Notam-se extensas áreas com perda de células endoteliais, com exposição de membrana basal (estrela), e presença de fissuras na camada íntima, expondo fibras colágenas (setas).

FIGURA 17 – Aspecto, em MEV com magnificação de quinhentas vezes, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 100 mmHg (Grupo SF 100).



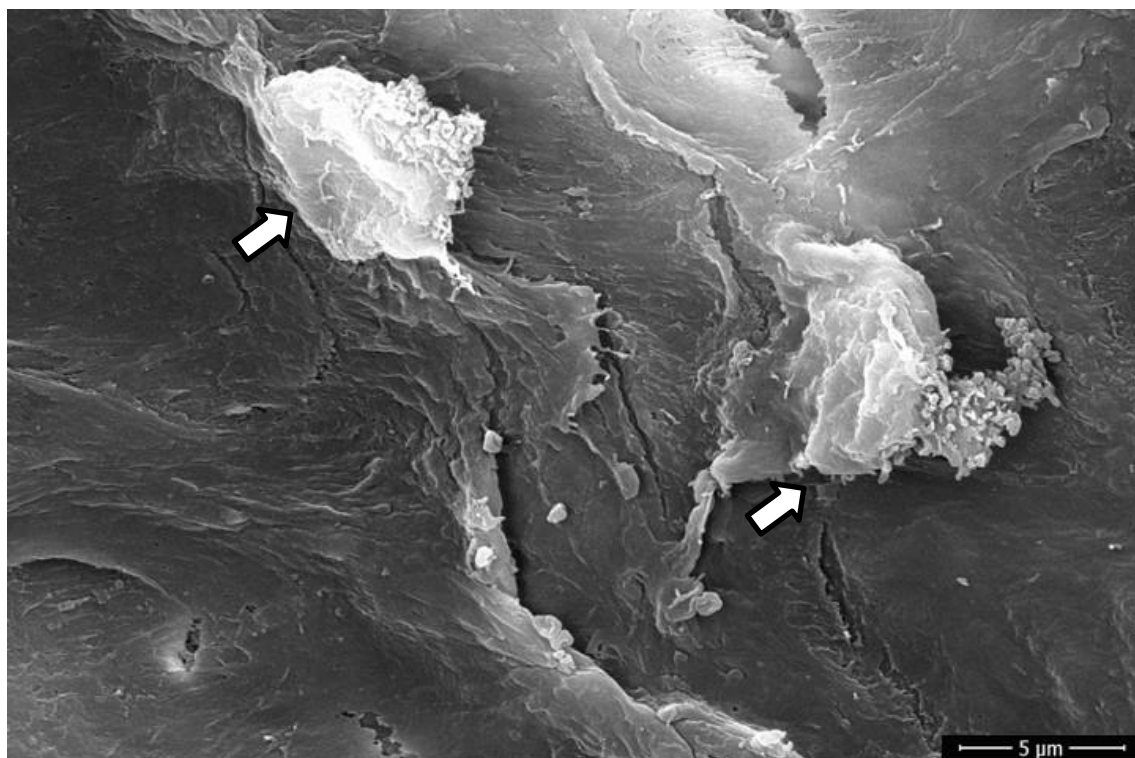
Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 500 vezes. Nota-se padrão de alongamento das células endoteliais, com maior separação destas (setas), além de fissuras na camada íntima (estrelas).

FIGURA 18 – Aspecto, em MEV com magnificação de 2000 vezes, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 100 mmHg (Grupo SF 100).



Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 2000 vezes. Nota-se em maior detalhe o alongamento das células (setas) e a exposição de camadas subendoteliais resultantes desse processo (estrelas).

FIGURA 19 – Aspecto, em MEV com magnificação de 12000 vezes, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 100 mmHg (Grupo SF 100).

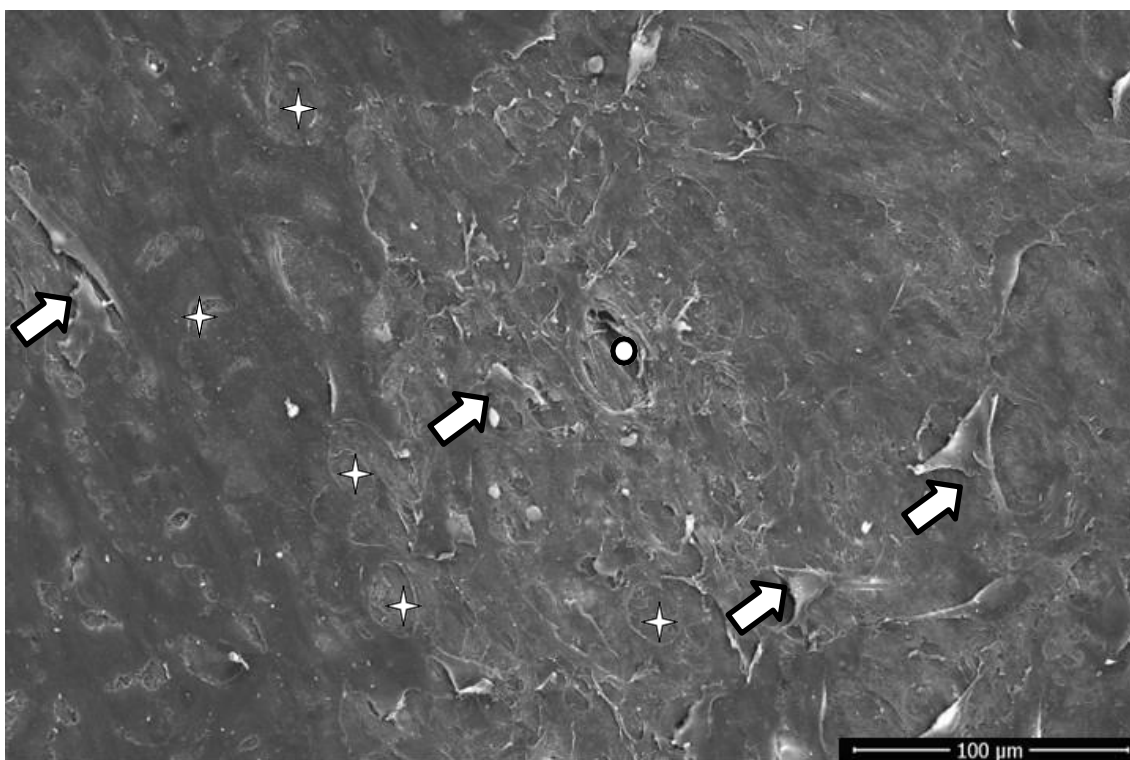


Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 12000 vezes. Detalha-se a deformação estrutural das células endoteliais, que perdem seu aspecto tipicamente aplainado (setas).

5.1.6 GRUPO 6

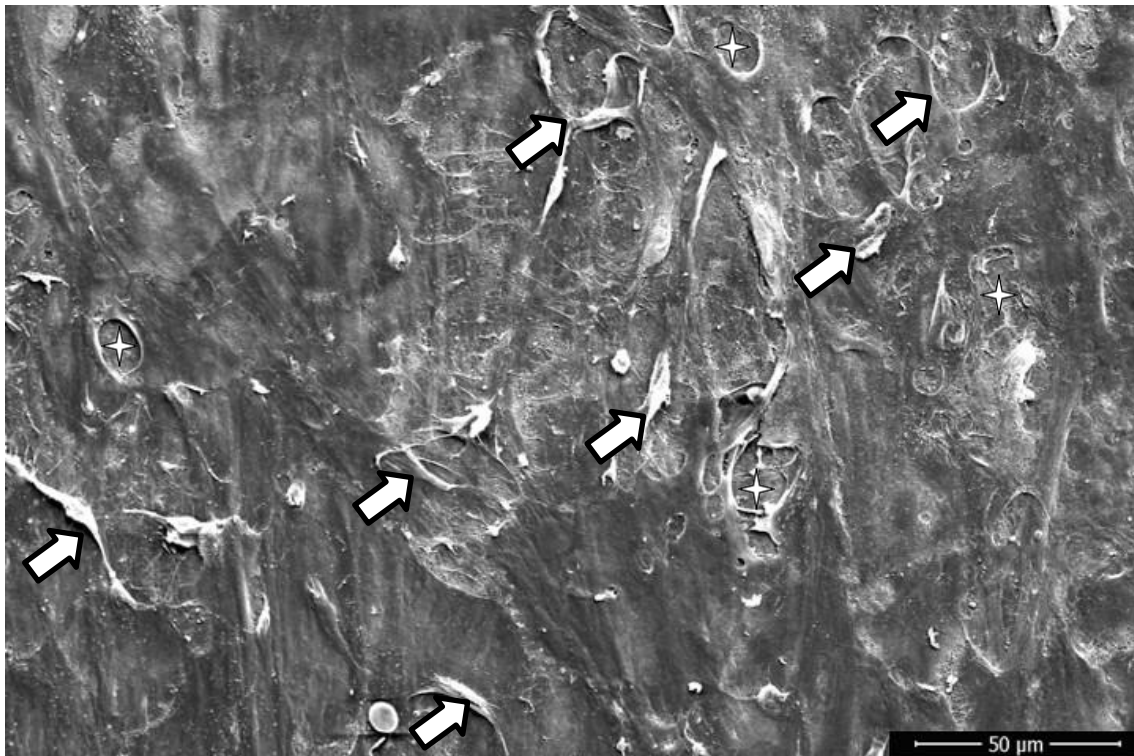
Segmentos venosos do Grupo SAH 300 foram distendidos com pressões superiores aquelas verificadas no sistema arterial e apresentaram maior deformação da arquitetura habitual da camada íntima, com extensa perda de células endoteliais, e exposição de membrana basal, mas com infrequente exposição de fibras colágenas. A FIGURA 20, FIGURA 21 e FIGURA 22 ilustram esses achados. O escore médio de dano deste grupo foi de $17,66 \pm 1,21$.

FIGURA 20 – Aspecto, em MEV com magnificação de mil vezes, de segmento de VSM preservado em SAH e distendido com pressão de 300 mmHg (Grupo SAH 300).



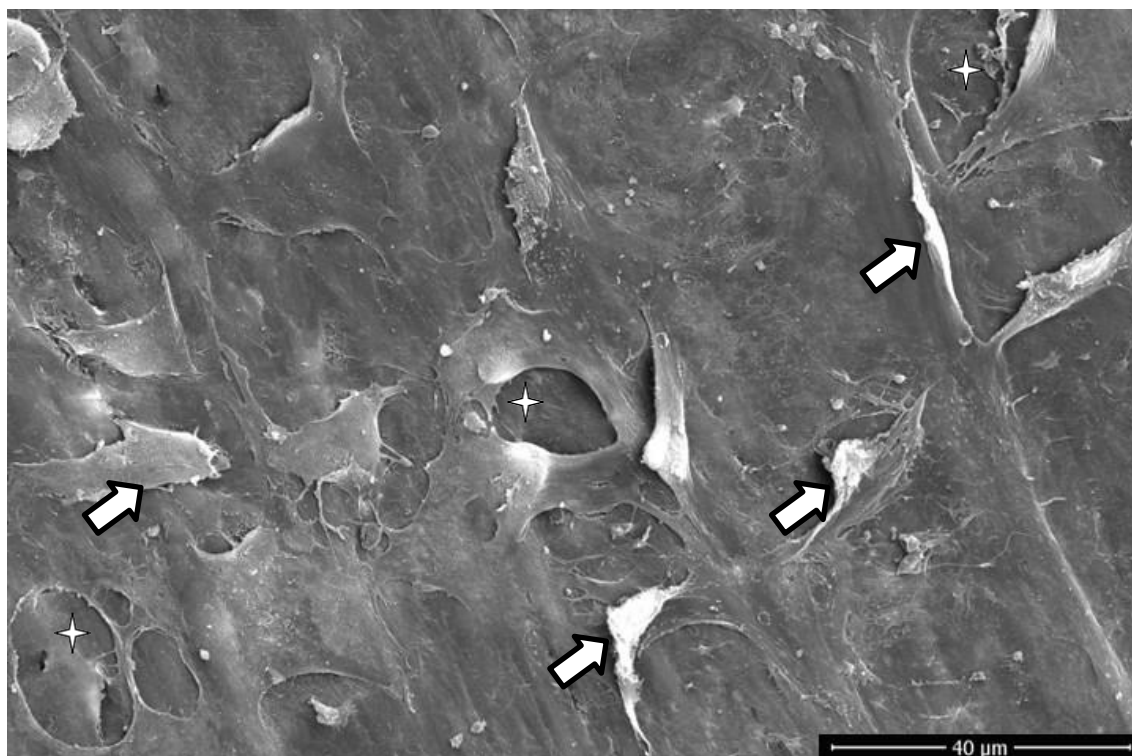
Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 1000 vezes. Nota-se presença de extensas áreas de perda e separação de células endoteliais (setas), com exposição de membrana basal (estrelas). Na área central da imagem, há discreta área com exposição de fibras colágenas (círculo).

FIGURA 21 – Aspecto, em MEV com magnificação de 1500 vezes, de segmento de VSM preservado em SAH e distendido com pressão de 300 mmHg (Grupo SAH 300).



Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 1500 vezes. Nota-se extensa separação de células endoteliais (setas), exposição de membrana basal (estrela).

FIGURA 22 – Aspecto, em MEV com magnificação de 2726 vezes, de segmento de VSM preservado em SAH e distendido com pressão de 300 mmHg (Grupo SAH 300).

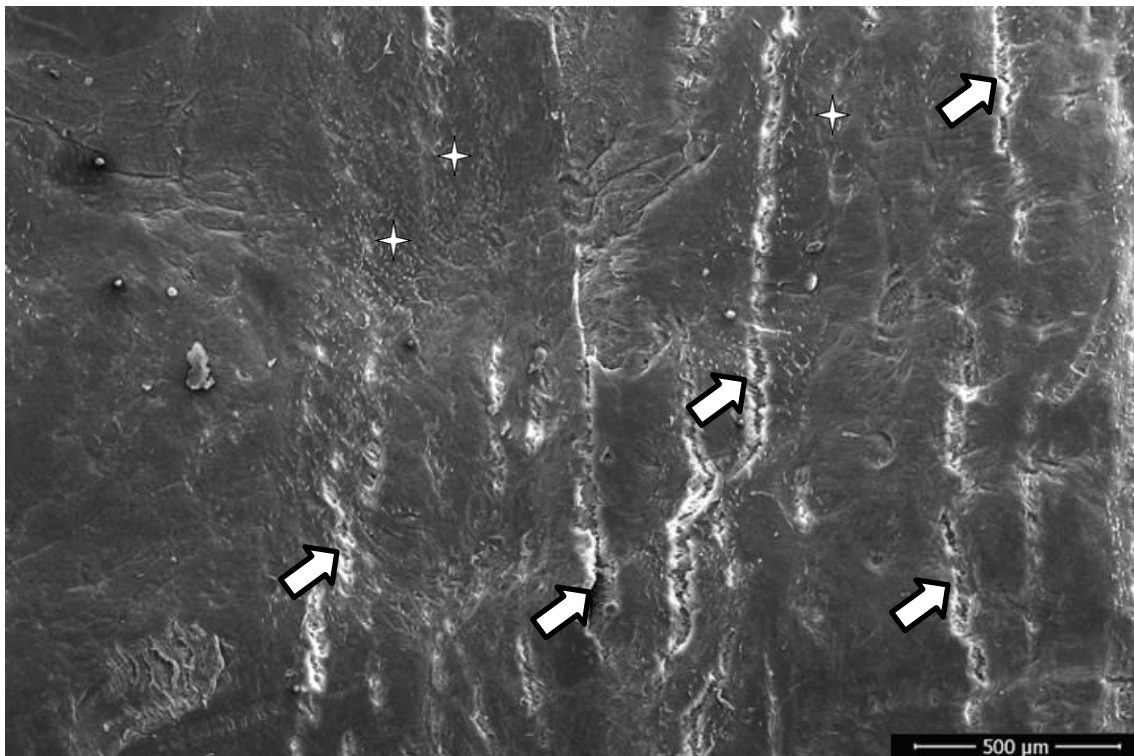


Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 2726 vezes. Nota-se em maior detalhe a separação das células endoteliais da membrana basal (setas), com exposição desta camada (estrelas).

5.1.7 GRUPO 7

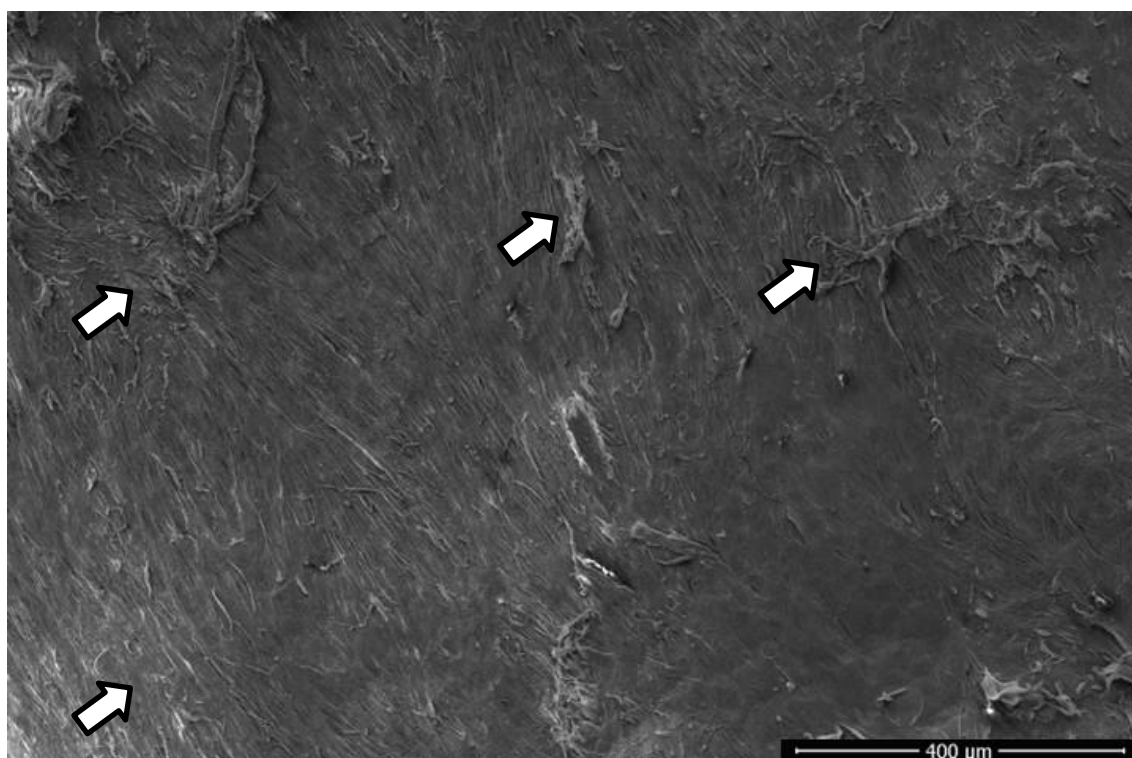
Segmentos do Grupo SF 300 apresentaram as alterações definidas no escore de dano em alto grau, assim como no Grupo SAH 300. Em praticamente toda a extensão dos segmentos venosos analisados, um padrão de exposição de separação de células endoteliais, com subsequente exposição de camadas subendoteliais foi notado (FIGURA 23 e FIGURA 24), além da presença de consideráveis fissuras na camada íntima (FIGURA 25), com presença de fibrina e aglomerados plaquetários aderidos às fibras colágenas expostas (FIGURA 26). O escore médio de dano deste grupo foi de $18,83 \pm 0,98$.

FIGURA 23 – Aspecto, em MEV com magnificação de 150 vezes, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 300 mmHg (Grupo SF 300).



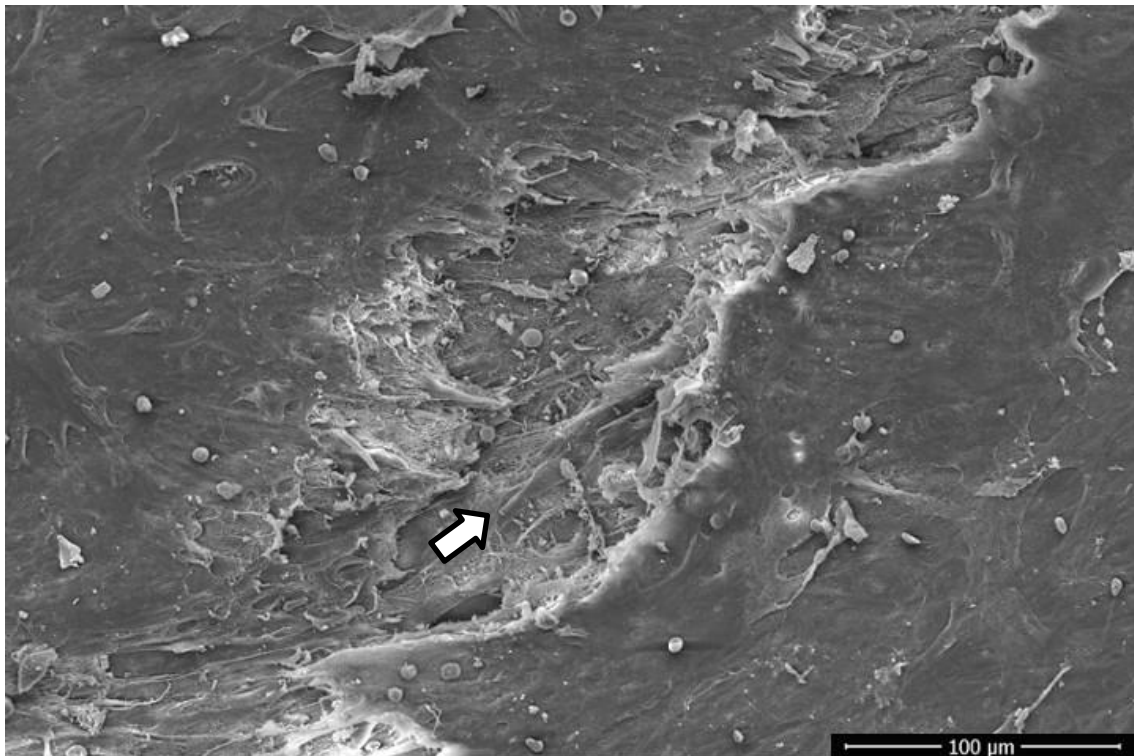
Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 150 vezes. Notam-se extensas e contínuas fissuras ao longo da camada íntima, com perda de células endoteliais (setas), além de presença de células endoteliais com padrão alongado (estrelas).

FIGURA 24 – Aspecto, em MEV com magnificação de trezentas vezes, de segmento de VSM preservado em SF e distendido com pressão de 300 mmHg (Grupo SF 300).



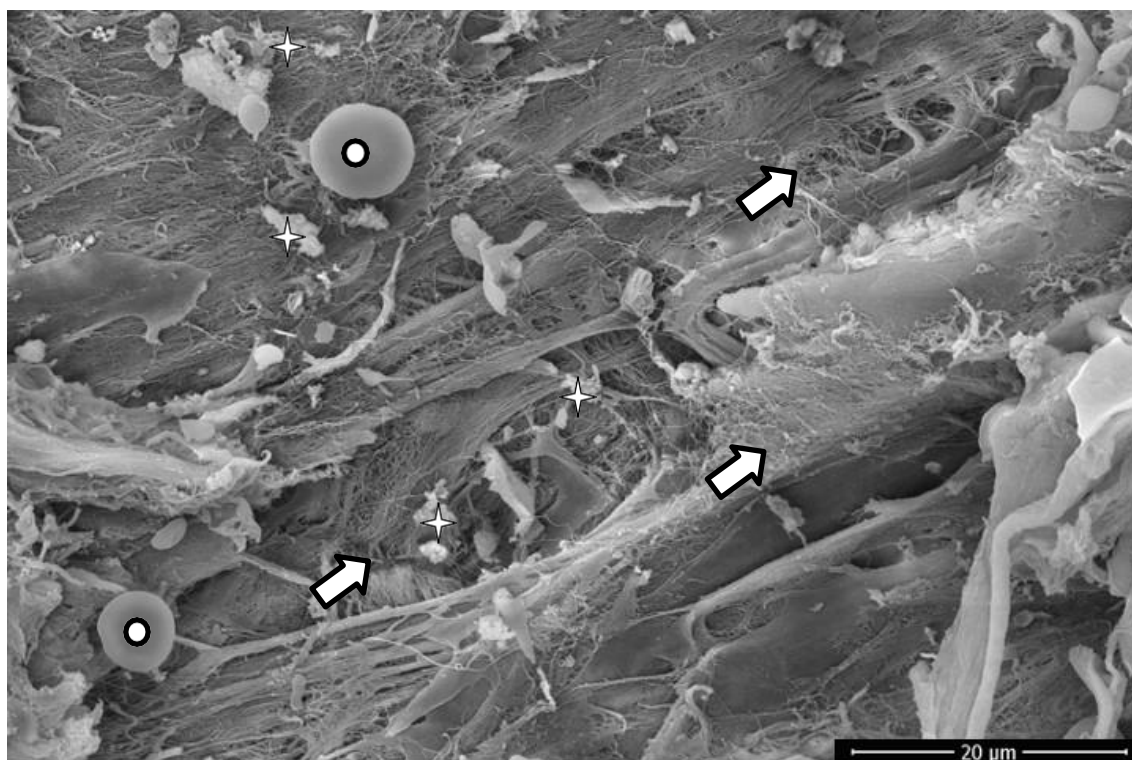
Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 300 vezes. Nota-se considerável separação e perda de células endoteliais, com perda da homogeneidade habitual da camada íntima .

FIGURA 25 – Aspecto, em MEV com magnificação de mil vezes, de segmento de VSM preservado em SF a 0,9% e distendido com pressão de 300 mmHg (Grupo SF 300).



Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 1000 vezes. Nota-se, em maior detalhe, aspecto de fissura da camada íntima (seta), com exposição das camadas subendoteliais.

FIGURA 26 – Aspecto, em MEV com magnificação de 5000 vezes, de segmento de VSM preservado em SF a 0,9% e distendido com pressão de 300 mmHg (Grupo SF 300).



Fonte: Obtida pelo autor. Superfície luminal da VSM analisada por MEV, com magnificação de 5000 vezes. Nota-se em alto detalhamento, o microambiente de fissura da camada endotelial, com desarranjo das fibras colágenas (setas), além da presença de hemácias (círculos) e de aglomerados de fibrina e de plaquetas (estrelas).

5.2 ANÁLISE COMPARATIVA DA INFLUÊNCIA DA SOLUÇÃO DE PRESERVAÇÃO E DAS PRESSÕES DE DISTENSÃO SOBRE O DANO ENDOTELIAL DA VSM

O uso de SF ou com SAH, bem como a distensão da VSM com diferentes pressões intraluminais, de 30 mmHg, de 100 mmHg e de 300 mmHg, foram fatores relacionados a diferentes intensidades e padrões de dano ao endotélio. A influência destes fatores sobre a integridade endotelial foi mensurada com uso de um escore adaptado, em que se graduou de zero a vinte, de forma crescente, o grau de dano endotelial das amostras de VSM estudadas. A comparação do grau de dano endotelial do grupo controle em relação aos grupos em que houve preservação com SF ou SAH, bem como distensão com pressões intraluminais de 30 mmHg, 100 mmHg e 300 mmHg, encontra-se detalhada na TABELA 2 e no GRÁFICO 1.

Constatou-se que o dano estrutural global verificado nos grupos expostos aos meios de preservação e submetidos às pressões de distensão foi significativamente maior que o observado no grupo Controle. Todavia, em comparação com a exposição ao meio de preservação SF, a exposição ao meio de preservação SAH reduziu significativamente o dano estrutural global para as pressões de distensão de 30 e 100 mmHg. Ademais, tanto para a exposição ao meio de preservação SF como SAH, o dano estrutural global aumentou significativamente com o incremento da pressão de distensão para 300 mmHg.

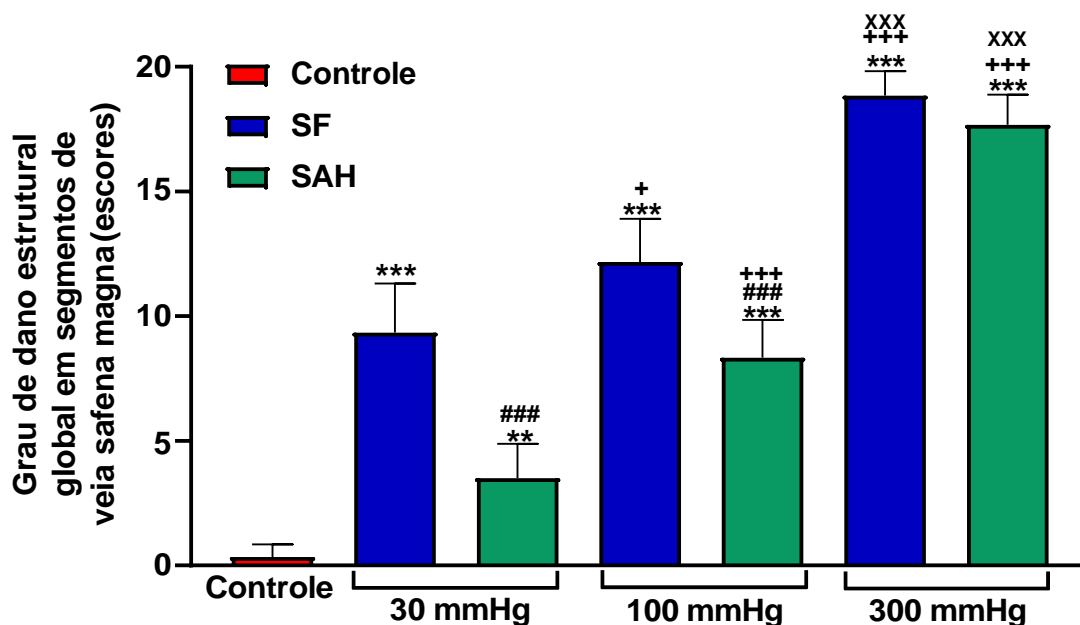
TABELA 2. Avaliação do grau de dano estrutural global em segmentos de VSM expostos ou não (Controle) aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos ou não (Controle) à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg.

Controle (Média ± DP)	30 mmHg		100 mmHg		300 mmHg	
	SF (Média ± DP)	SAH (Média ± DP)	SF (Média ± DP)	SAH (Média ± DP)	SF (Média ± DP)	SAH (Média ± DP)
0,33 ± 0,52	9,33 ± 1,97 ^a	3,50 ± 1,38 ^{b,c}	12,17 ± 1,72 ^{a,e}	8,33 ± 1,51 ^{a,c,f}	18,83 ± 0,98 ^{a,f,g}	17,67 ± 1,21 ^{a,f,g}

Fonte: Dados da pesquisa. Os dados correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em 6 segmentos de VSM de cada grupo. DP: desvio padrão. As letras a(P<0,001) e b(P<0,01) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Controle, enquanto a letra c(P<0,001) significa diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo tratado com SF na mesma pressão de distensão (teste de comparações múltiplas de Tukey). As letras e(P<0,05) e f(P<0,001) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo submetido à pressão de distensão de 30 mmHg no mesmo meio de preservação, enquanto a letra g(P<0,001) corresponde a diferenças estatisticamente significantes em relação ao

grupo submetido à pressão de distensão de 100 mmHg no mesmo meio de preservação (teste de comparações múltiplas de Tukey).

GRÁFICO 1. Avaliação do grau de dano estrutural global em segmentos de VSM expostos ou não (Controle) aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos ou não (Controle) à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg.



Fonte: Dados da pesquisa. Os dados correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em 6 segmentos de VSM de cada grupo. Os símbolos **($P < 0,01$) e ***($P < 0,001$) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Controle, enquanto o símbolo ###($P < 0,001$) significa diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo tratado com SF na mesma pressão de distensão. Os símbolos +($P < 0,05$) e +++($P < 0,001$) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo submetido à pressão de distensão de 30 mmHg no mesmo meio de preservação, enquanto o símbolo xxx($P < 0,001$) corresponde a diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo submetido à pressão de distensão de 100 mmHg no mesmo meio de preservação.

A avaliação do grau de dano estrutural global em segmentos de VSM em decorrência da exposição aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg encontra-se detalhada na TABELA 3 e no GRÁFICO 2. Constatou-se que a preservação com SAH reduziu significativamente o dano estrutural global em relação à preservação com SF, quando foram aplicadas as pressões de distensão de 30 e 100 mmHg. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os dois meios de preservação

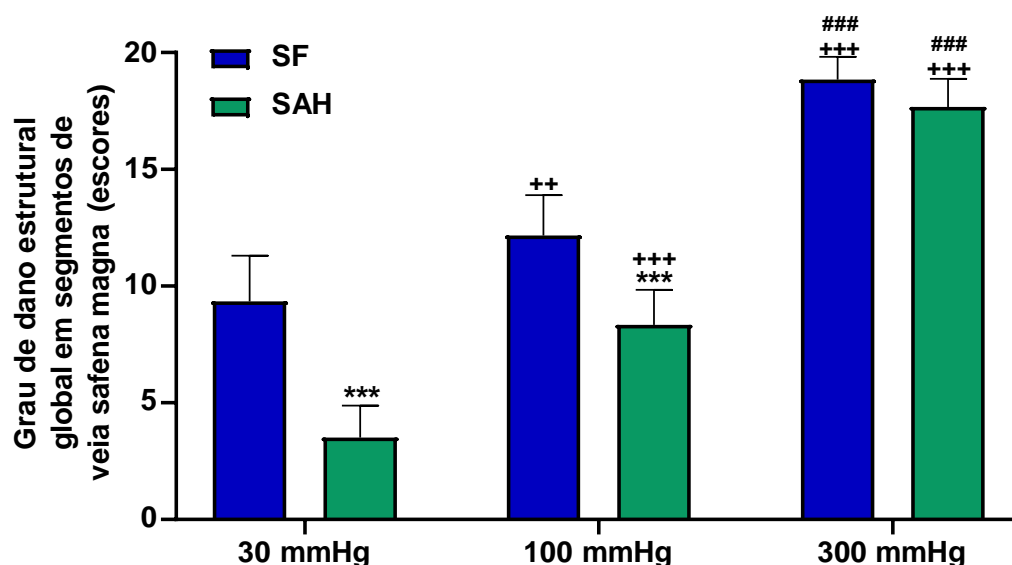
para a pressão de 300 mmHg. Ademais, tanto para a exposição ao meio de preservação SF como SAH, o dano estrutural global aumentou significativamente nos segmentos de VSM submetidos às pressões de distensão de 100 e 300 mmHg em comparação com aqueles distendidos com 30 mmHg. Igualmente, para ambos os meios de preservação, o dano estrutural global referente à pressão de distensão de 300 mmHg foi significativamente maior que o relativo à pressão de distensão de 100 mmHg

TABELA 3. Avaliação do grau de dano estrutural global em segmentos de VSM expostos aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg

Pressão de distensão	SF Média ± DP	SAH Média ± DP	Diferença de médias	IC 95% diferença	Significância*
30 mmHg	9,33 ± 1,97	3,50 ± 1,38	5,83	3,64 a 8,02	P < 0,0001
100 mmHg	12,17 ± 1,72 ^b	8,33 ± 1,51 ^a	3,84	1,64 a 6,02	P = 0,0003
300 mmHg	18,83 ± 0,98 ^{a,c}	17,67 ± 1,21 ^{a,c}	1,16	-1,02 a 3,36	P = 0,5609

Fonte: Dados da pesquisa. Os dados correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em 6 segmentos de VSM de cada grupo. DP: desvio padrão; IC 95%: intervalo de confiança de 95% da diferença de médias; *Teste de comparações múltiplas de Bonferroni. As letras a(P<0,0001) e b(P<0,0079) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo submetido à pressão de distensão de 30 mmHg no mesmo meio de preservação, enquanto a letra c(P<0,0001) indica diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo submetido à pressão de distensão de 100 mmHg no mesmo meio de preservação (teste de comparações múltiplas de de Bonferroni).

GRÁFICO 2. Avaliação do grau de dano estrutural global em segmentos de VSM expostos aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg.



Fonte: Dados da pesquisa. Os dados correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em 6 segmentos de VSM de cada grupo. O símbolo ***($P < 0,001$) denota diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo tratado com SF na mesma pressão de distensão. Os símbolos ++($P = 0,0079$) e +++($P < 0,0001$) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo submetido à pressão de distensão de 30 mmHg no mesmo meio de preservação, enquanto o símbolo ###($P < 0,0001$) corresponde a diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo submetido à pressão de distensão de 100 mmHg no mesmo meio de preservação.

O escore para avaliação do dano endotelial da VSM foi obtido por meio da análise de cinco parâmetros: grau de separação de células endoteliais, grau de perda de células endoteliais, grau de exposição da membrana basal, grau de exposição de colágeno fibrilar e presença de fissuras na camada íntima. Também se analisou como as diferentes soluções de preservação e as crescentes pressões de distensão intraluminal afetaram cada um destes parâmetros. Estes dados encontram-se detalhados na TABELA 4 e no GRÁFICO 3, GRÁFICO 4, GRÁFICO 5, GRÁFICO 6, GRÁFICO 7.

Constatou-se um aumento significativo de todos os parâmetros, em relação ao grupo Controle, quando os segmentos de VSM foram submetidos a uma pressão de distensão de 300 mmHg, independentemente do tipo de meio de preservação. Observou-se, ainda, um aumento significativo do grau de perda de células endoteliais e de exposição de colágeno fibrilar, em

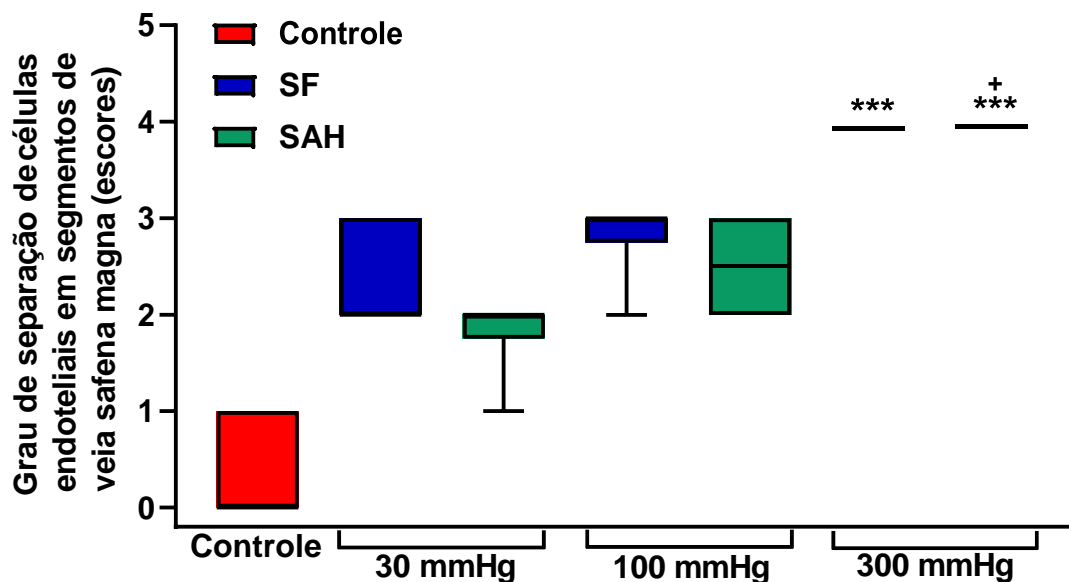
relação ao grupo Controle, nos segmentos de VSM que foram submetidos a uma pressão de distensão de 100 mmHg, porém apenas quando expostos ao meio de preservação SF. Ademais, considerando a exposição ao meio de preservação SAH, verificou-se um aumento significativo de todos os parâmetros quando os segmentos de VSM foram submetidos a uma pressão de distensão de 300 mmHg em relação à pressão de distensão de 30 mmHg.

TABELA 4. Avaliação do dano estrutural tecidual em segmentos de VSM expostos ou não (Controle) aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos ou não (Controle) à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg, por meio da análise de cinco parâmetros: grau de separação de células endoteliais, grau de perda de células endoteliais, grau de exposição da membrana basal, grau de exposição de colágeno fibrilar e presença de fissuras na camada íntima.

Parâmetro	Controle Mediana (IIQ)	30 mmHg		100 mmHg		300 mmHg	
		SF Mediana (IIQ)	SAH Mediana (IIQ)	SF Mediana (IIQ)	SAH Mediana (IIQ)	SF Mediana (IIQ)	SAH Mediana (IIQ)
Separação de células endoteliais	0,00 (0,00 a 1,00)	2,00 (2,00 a 3,00)	2,00 (1,75 a 2,00)	3,00 (2,75 a 3,00)	2,50 (2,00 a 3,00)	4,00 (4,00 a 4,00) ^a	4,00 (4,00 a 4,00) ^{a,d}
Perda de células endoteliais	0,00 (0,00 a 0,00)	2,00 (1,75 a 3,00)	1,00 (1,00 a 1,00)	3,00 (3,00 a 3,00) ^b	2,00 (2,00 a 2,00)	4,00 (4,00 a 4,00) ^a	4,00 (4,00 a 4,00) ^{a,e}
Exposição da membrana basal	0,00 (0,00 a 0,00)	2,00 (1,75 a 2,25)	0,00 (0,00 a 0,25)	2,50 (1,75 a 3,00)	2,00 (1,00 a 2,00)	3,50 (3,00 a 4,00) ^b	4,00 (4,00 a 4,00) ^{a,f}
Exposição de colágeno fibrilar	0,00 (0,00 a 0,00)	2,00 (1,00 a 2,00)	0,00 (0,00 a 0,00)	2,50 (2,00 a 3,00) ^c	1,00 (0,00 a 1,00)	4,00 (4,00 a 4,00) ^a	3,00 (2,00 a 3,00) ^{c,d}
Fissuras na camada íntima	0,00 (0,00 a 0,00)	1,00 (1,00 a 1,25)	0,00 (0,00 a 1,25)	1,50 (1,00 a 2,00)	1,50 (1,00 a 2,00)	3,50 (2,75 a 4,00) ^a	3,00 (2,00 a 4,00) ^{a,d}

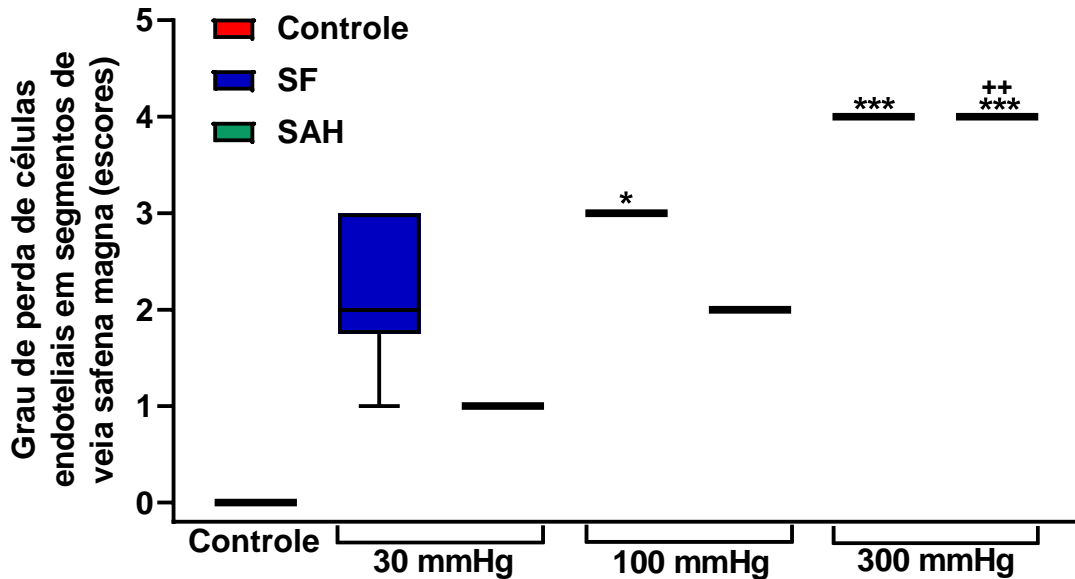
Fonte: Dados da pesquisa. Dados correspondem à média e desvio padrão das medições em seis segmentos de VSM. IIQ: intervalo interquartil. As letras ^a(P<0,001), ^b(P<0,01) e ^c(P<0,05) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Controle, as letras ^d(P<0,05), ^e(P<0,01) e ^f(P<0,001) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo submetido à pressão de distensão de 30 mmHg e exposto a SAH (teste de comparações de Dunnett).

GRÁFICO 3. Avaliação do grau de separação de células endoteliais em segmentos de VSM expostos ou não (Controle) aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos ou não (Controle) à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg.



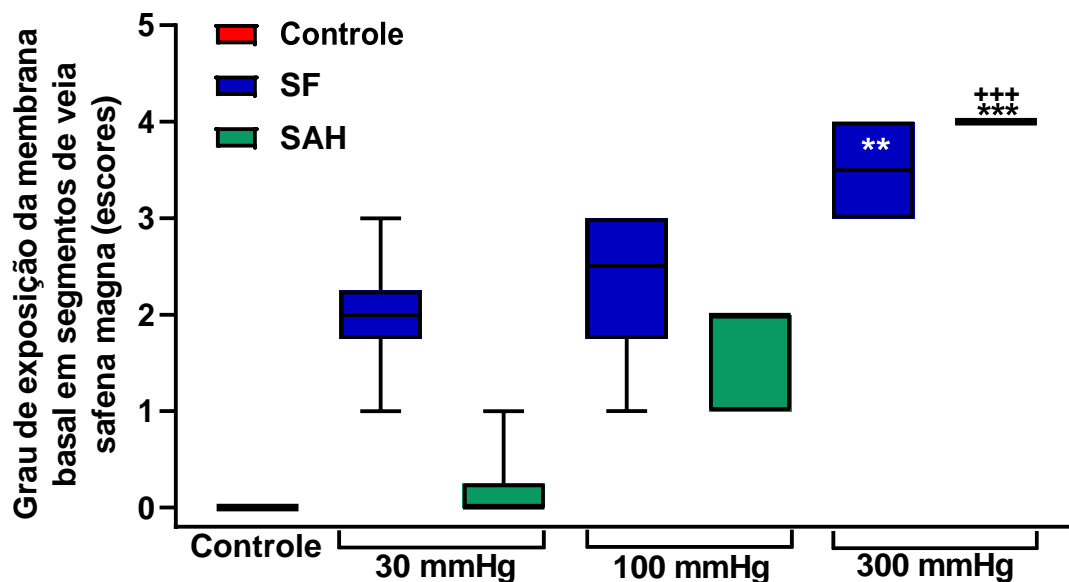
Fonte: Dados da pesquisa. Dados expressos como mediana, percentil 25 e percentil 75 (intervalo interquartil) e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 segmentos de VSM de cada grupo. O símbolo ***($P < 0,001$) denota diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Controle, enquanto o símbolo +($P < 0,05$) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo submetido à pressão de distensão de 30 mmHg e exposto ao meio de preservação SAH.

GRÁFICO 4. Avaliação do grau de perda de células endoteliais em segmentos de VSM expostos ou não (Controle) aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos ou não (Controle) à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg.



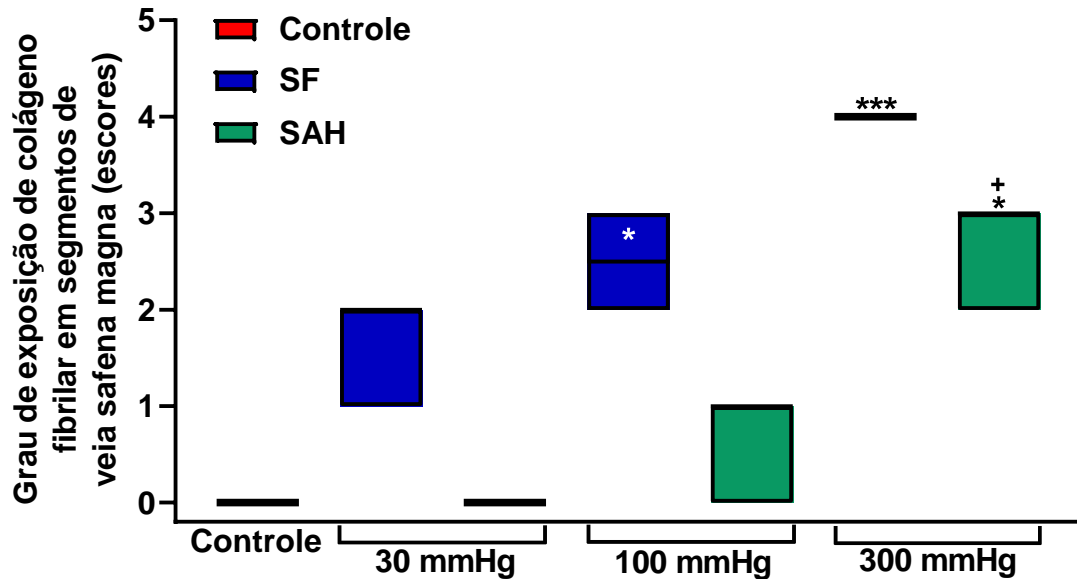
Fonte: Dados da pesquisa. Dados expressos como mediana, percentil 25 e percentil 75 (intervalo interquartil) e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 segmentos de VSM de cada grupo. Os símbolos *($P < 0,05$) e ***($P < 0,001$) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Controle, enquanto o símbolo ++($P < 0,01$) indica diferença estatisticamente significante em relação ao grupo submetido à pressão de distensão de 30 mmHg e exposto ao meio de preservação SAH.

GRÁFICO 5. Avaliação do grau de exposição da membrana basal em segmentos de VSM expostos ou não (Controle) aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos ou não (Controle) à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg.



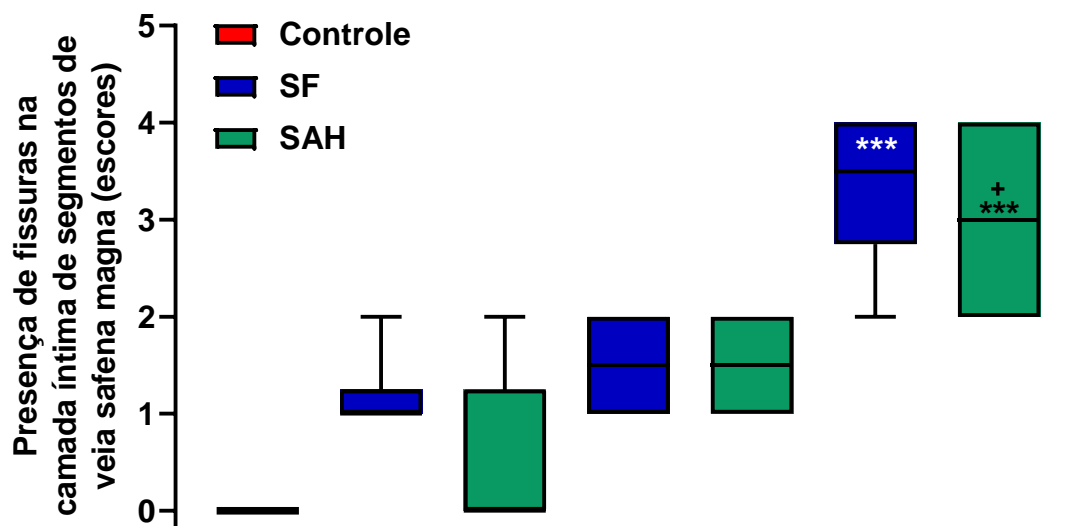
Fonte: Dados da pesquisa. Dados expressos como mediana, percentil 25 e percentil 75 (intervalo interquartil) e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 segmentos de VSM de cada grupo. Os símbolos **($P < 0,01$) e ***($P < 0,001$) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Controle, enquanto o símbolo +++($P < 0,001$) indica diferença estatisticamente significante em relação ao grupo submetido à pressão de distensão de 30 mmHg e exposto ao meio de preservação SAH.

GRÁFICO 6. Avaliação do grau de exposição de colágeno fibrilar em segmentos de VSM expostos ou não (Controle) aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos ou não (Controle) à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg.



Fonte: Dados da pesquisa. Dados expressos como mediana, percentil 25 e percentil 75 (intervalo interquartil) e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 segmentos de VSM de cada grupo. Os símbolos *($P < 0,05$) e ***($P < 0,001$) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Controle, enquanto o símbolo +($P < 0,05$) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo submetido à pressão de distensão de 30 mmHg e exposto ao meio de preservação SAH.

GRÁFICO 7. Avaliação da presença de fissuras na camada íntima de segmentos de VSM expostos ou não (Controle) aos meios de preservação com SF e SAH e submetidos ou não (Controle) à distensão com pressões de 30, 100 e 300 mmHg.



Fonte: Dados da pesquisa. Dados expressos como mediana, percentil 25 e percentil 75 (intervalo interquartil) e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 segmentos de VSM de cada grupo. O símbolo *** ($P < 0,001$) denota diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Controle, enquanto o símbolo + ($P < 0,05$) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo submetido à pressão de distensão de 30 mmHg e exposto ao meio de preservação SAH.

6. DISCUSSÃO

A despeito das crescentes evidências recentes recomendando o uso exclusivo de enxertos arteriais, a VSM, devido a sua facilidade de dissecação, disponibilidade e baixa taxa de complicações relacionadas a sua exérese, segue sendo amplamente utilizada na CRM. As limitações do enxerto venoso envolvem sobretudo as baixas de taxas de perviabilidade em longo prazo obtidas com esses condutos. No entanto, a necessidade de obter-se revascularização miocárdica completa, e as complicações envolvidas na exérese de enxertos arteriais fazem com que seu uso ainda seja restrito, sobretudo em serviços com menos recursos (CALISKAN *et al.*, 2019; WOODWARD; ANTONIADES; TAGGART, 2016).

Nesse contexto, diversos autores buscaram, ao longo das últimas décadas, desenvolver metodologias de exérese, conservação e preparo perioperatório dos segmentos venosos de modo a reduzir os danos decorrentes do manuseio cirúrgico (WOODWARD; ANTONIADES; TAGGART, 2016). O processo de obtenção da VSM para uso na CRM envolve a exérese desta veia de um ou ambos os membros inferiores, com sua habitual conservação em uma solução, e distensão intraluminal do conduto para verificar possíveis danos à integridade estrutural do vaso, algo que, se presente, resultaria em vazamento de sangue e complicações pós-operatórias. Esses processos, embora amplamente adotados na rotina dos serviços de cirurgia cardiovascular, não são inertes ao endotélio venoso, podendo ocasionar considerável dano a esta estrutura, aumentando o risco de oclusão do enxerto (BONCHEK, 1980; ANGELINI; NEWBY, 1989).

Diversos fatores patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento de lesão endotelial nos segmentos venosos. Hofer *et al.*, ainda em 1981, ilustraram que alterações morfológicas nos enxertos de VSM utilizados na CRM podem ser decorrentes de cinco fatores predominantemente: alterações intrínsecas ao paciente, que ocorrem no endotélio em decorrência do envelhecimento; lesão mecânica durante exérese do enxerto; lesões decorrentes de hipóxia; lesões decorrentes de distensão dos enxertos; e lesões decorrentes das características da solução de preservação da VSM (HOFER *et al.*, 1981).

A VSM, assim como outros vasos do corpo, está sujeita a alterações decorrentes da menor capacidade de manutenção da fisiologia resultante do envelhecimento. Estudos avaliando o endotélio desta veia antes de seu uso como enxerto vascular demonstram que pode haver a presença de hiperplasia intimal com infiltração de células musculares lisas,

esclerose da camada muscular média, calcificação endotelial e dilatação luminal por perda da elasticidade (MARIN *et al.*, 1993; MARIN *et al.*, 1994; PANETTA *et al.*, 1992).

Panetta *et al.* evidenciaram que na população de pacientes com maior grau de hiperplasia intimal e de degeneração endotelial, diabetes mellitus tipo 2 era comorbidade significativamente mais incidente, fato corroborado pelo estudo de Marin *et al.*, que ilustrou a presença desta comorbidade nos segmentos com maior grau de dano endotelial pré-operatório (MARIN *et al.*, 1994; PANETTA *et al.*, 1992).

Os fatos acima descritos fizeram com que pacientes diabéticos fossem não fossem incluídos no estudo desta dissertação, de modo a reduzir vieses decorrentes de possíveis danos endoteliais pré-existentes. Ressalta-se que, neste estudo, pacientes com evidências ultrassonográficas pré-operatórias de espessamento intimal, calcificação e/ou varicosidades na VSM também não foram incluídos. Mesmo assim, no grupo controle, dois segmentos apresentaram discreto grau de lesão, menor que 10% de cada amostra, em que houve discreta perda de células endoteliais, aspecto provavelmente relacionada à exérese cirúrgica da VSM.

Desde o início do uso sistemático da VSM na CRM, diversos autores buscaram desenvolver técnicas de exérese, preservação e preparo que promovessem menor dano endotelial ao enxerto venoso. Sabe-se, desde a década de 1960, que o manuseio inadequado do enxertos vasculares, com excessiva distensão, compressão, ou lesões incisivas sobre a parede vascular, ocasiona não apenas dano endotelial direto, mas também disfunção da fibrinólise vascular, gerando maior deposição de fibrina com maior risco de formação de trombos e oclusão precoce do enxerto (ACINAPURA *et al.*, 1966; ANGELINI; NEWBY, 1989; CATINELLA *et al.*, 1982).

Tendo isso em vista, as técnicas de dissecação da VSM foram sendo aprimoradas sobretudo focando em três aspectos: redução do trauma direto durante exérese, com preservação o tecido perivascular; escolha de soluções de preservação mais fisiológicas; e uso de menores pressões de distensão, de modo a apenas superar o vasoespasmo venoso (ANGELINI; NEWBY, 1989; BONCHEK, 1980).

A escolha da solução de preservação mais adequada para a preservação da VSM é um debate que se estende há décadas na literatura médica, e, embora conclusões sobre os efeitos potencialmente danosos do uso de SF sejam indicadas, ainda hoje nota-se a adoção desta solução para preservação de enxertos vasculares, pela sua disponibilidade e facilidade de uso

e pla asuência de consenso e de estudos que efetivamente indiquem a superioridade do SAH ou de qualquer outra solução para preservação endotelial destes enxertos (TSAKOK; MONTGOMERY-TAYLOR; TSAKOK, 2012; WOODWARD; ANTONIADES; TAGGART, 2016).

Na década de 1970, Abott *et al.* evidenciaram que segmentos de VSM preservados em solução salina normotérmica apresentavam considerável dano endotelial, quando comparados àqueles segmentos preservados com SAH (ABBOTT; WIELAND; AUSTEN, 1974). Gundry *et al.*, por sua vez, em estudo a ser detalhado a seguir, realizaram ampla análise, com uso de MEV, de segmentos de VSM preservados com SF ou SAH sob diferentes pressões de distensão evidenciando que os segmentos venosos preservados com solução de cloreto de sódio a 0,9% apresentam separação e perda de células endoteliais, além de diversas fissuras na camada íntima, em quantidade maior que a verificadas nos grupos tratados com SAH (GUNDRY, 1980).

Outros estudos avaliaram, ao invés da integridade morfológica, a capacidade funcional endotelial. Em 1990, Lawrie, Weilbacher e Henry, avaliaram 139 segmentos de VSM preservados com SF, solução salina tamponada ou SAH. Notou-se que nos segmentos expostos a SF houve menor expressão de NO, indicando maior disfunção endotelial (LAWRIE; WEILBACHER; HENRY, 1990). Três anos depois, Zerkowski analisou a capacidade de contração e relaxamento endotelial após administração de noradrenalina e de acetilcolina respectivamente. Para isso, sessenta segmentos de VSM foram incubados em diferentes soluções, sendo estas SAH, solução de ringer, solução de albumina humana e solução cardioplégica composta por histidina, triptofano e ketogluturato. Notou-se que segmentos venosos preservados com sangue arterial apresentavam vasorreatividade consideravelmente maior que aqueles preservados com outras soluções, o que indicaria maior integridade funcional do endotélio (ZERKOWSKI *et al.*, 1993).

Mais recentemente, em 2013, Wilbring *et al.* analisaram a contratilidade vascular e função endotelial de 36 segmentos de VSM preservados com SF ou com SAH. Observou-se piroa considerável na capacidade contrátil, e na vasodilatação dependente do endotélio dos segmentos venosos preservados com SF, com os autores contraindicando o uso de solução salina com cloreto de sódio a 0,9% como meio de conservação da VSM (WILBRING *et al.*, 2013). Há também indícios de que a preservação da VSM com SAH faria com que este enxerto permanecesse em um microambiente celular com menor expressão de fatores pró-

inflamatórios e menor quantidade de ERO, do que quando preservado em SF (CHEN *et al.*, 2019).

O mecanismo pelo qual a SF induz o dano endotelial em enxertos vasculares é ainda discutido, mas alguns autores ilustram os potenciais processos fisiopatológicos envolvidos. Cheung-Flynn *et al.*, em 2019, evidenciaram que a exposição do endotélio a SF não-tamponada está associada a ativação de uma via celular pró-inflamatória, a saber a via P2X7R/p38MAPK/MK2, resultando em perda da integridade celular endotelial e disfunção destas células. Além disso, o fato desta solução não-tamponada apresentar pH ácido (~5,0), seria fator também diretamente lesivo ao endotélio, com aumento da permeabilidade endotelial, perda do relaxamento vascular dependente do endotélio, com menor expressão de enzimas produtoras de NO (CHEUNG-FLYNN *et al.*, 2019; WISE *et al.*, 2015). Este fato foi corroborado por estudo com imunohistoquímica e microscopia de fluorescência que evidenciou que a viabilidade das células endoteliais e das células musculares lisas vasculares foi completamente perdida quando estas foram expostas a soluções com pH abaixo de 6,0 (BISWAS *et al.*, 2001).

Apesar destas evidências ilustrando efeitos detrimenais da SF para preservação da VSM, alguns estudos demonstram resultados diferentes, contestando o potencial benefício do uso de soluções sanguíneas. Alguns autores ilustram que, quando preservados em quaisquer dessas soluções os segmentos de VSM estudados apresentaram similar padrão de dano endotelial, expressando níveis similares de marcadores bioquímicos associados a lesão celular (BUSH *et al.*, 1986; CHESTER *et al.*, 1993). Outro ponto de debate, como foi verificado por Weiss *et al.*, é que segmentos de VSM preservados em SAH ou SF apresentaram as mesmas características pró-trombóticas após arterialização, com perda dos benefícios advindos do uso da solução sanguínea (WEISS *et al.*, 2009).

Em suma, espera-se que uma maior preservação endotelial da VSM durante seu manuseio cirúrgico resulte em melhores desfechos, em especial com menores taxas de oclusão do enxerto venosos, e melhores resultados clínicos. No entanto, são escassos os estudos recentes que avaliam o impacto clínico destas medidas. Em modelos animais, Fouquet *et al.* ilustraram que segmentos venosos preservados com solução salina não tamponada, seis semanas após serem anastomosados ao leito arterial, apresentaram taxas de oclusão significativamente maiores do que aqueles segmentos preservados com sangue arterial. Em humanos, relata-se como digno de nota o estudo de Harskamp *et al.* que, em 2014, realizaram

análise de 4323 enxertos venosos obtidos de 1828 pacientes. Estes foram preservados em SF com NaCl a 0,9%, soluções salinas tamponadas ou sangue arterial autólogo. Evidenciou-se o uso de SF padrão foi associada a piores desfechos clínicos, como morte, IAM e necessidade de nova revascularização, sendo os melhores desfechos obtido com uso de soluções tamponadas, sendo o sangue arterial um meio de preservação com resultados clínicos intermediários (HARSKAMP *et al.*, 2014). Estes resultados clínicos, no entanto, ainda requerem comprovação por estudos randomizados enfocando apenas os aspectos relacionados a soluções de preservação, e com maior homogeneidade destas, uma vez que no estudo de Harskamp, a adição de heparina e soluções cardioplégicas não foi uniforme.

A falta de consenso da literatura quanto a qual solução de preservação utilizar ocasiona uma heterogeneidade no preparo da VSM pelos cirurgiões cardiovasculares que segue até os dias atuais. Isto é observado em pesquisa realizada com cirurgiões de noventa hospitais dos EUA. Os achados foram de que 83,3% desses utilizavam CRM com ao menos um enxerto venoso, e que 56,7% dos enxertos permaneciam mais de 15 minutos preservados *ex vivo* em soluções de preservação. Em relação a estas soluções, 28,9% dos centros utilizavam SF, 40% soluções salinas tamponadas e 26,7%, adotavam sangue arterial como solução rotineira. Em 88,9% dos casos essa solução era heparinizada, e em 74,4% dos casos permanecia em temperatura ambiente (WILLIAMS *et al.*, 2015). Isso evidencia que, apesar da VSM ser amplamente utilizada, não há clara padronização quanto às técnicas para sua preservação, o que pode justificar parte dos resultados não satisfatórios em longo prazo obtidos com esse enxerto.

A distensão intraluminal da VSM é o outro fator de suma relevância para a integridade endotelial da VSM. Relatos da década de 1980, ilustrando as técnicas ideais para preparo da VSM na CRM, ilustravam que a distensão desta veia a pressões de 200-300 mmHg seria prática segura e recomendada como padrão durante o preparo desta (LOGGERFO; HAUDENSCHILD; QUIST, 1984). No entanto, os impactos de pressões de distensão acima de 100 mmHg sobre o endotélio venoso são deletérios, comprometendo sua integridade estrutural e funcional (ANGELINI *et al.*, 1987; HASSE *et al.*, 1981; MILLS; EVERSON, 1995).

Enquanto fisiologicamente, as pressões hidrostáticas às quais a VSM é habitualmente submetida oscilam entre 5-35 mmHg, podendo a chegar a 50 mmHg em situações extremas, a súbita distensão deste vaso a altas pressões ocasiona consideráveis mudanças no endotélio e

na camada muscular lisa vascular. Por exemplo, um aumento da pressão intraluminal de 10 para 100 mmHg, ocasiona um aumento de quinze vezes no estresse circunferencial medido na parede vascular, e que aumenta exponencialmente com pressões de distensão superiores a esta (GOOCH *et al.*, 2018; GUSIC *et al.*, 2005).

A utilização de elevadas pressões de distensão intraluminal nos enxertos venosos ocasiona notáveis alterações na camada endotelial (MILLS; EVERSON, 1995; STIGLER *et al.*, 2012; TINELI *et al.*, 2007). Isto foi evidenciado por Viaro *et al.* que, em 2010, analisaram a expressão de NO e o aspecto do endotélio de segmentos humanos de VSM submetidos *in vitro* a pressões de distensão de 100 mmHg, 200 mmHg e 300 mmHg por quinze segundos. Notou-se que, nos segmentos distendidos até 100 mmHg não houve diferenças na expressão de NO nem na cobertura endotelial dos segmentos em comparação às porções de VSM que não foram distendidas. Distensão a 200 mmHg reduziu a área de cobertura endotelial, mas não de forma estatisticamente significativa, enquanto pressurizações de 300 mmHg resultaram em praticamente total denudação da camada endotelial (VIARO *et al.*, 2010).

Outros pesquisadores realizaram estudos similares, ilustrando limites para distensão segura da VSM. Chester *et al.* observaram que, após distensão da VSM com 100 mmHg de pressão por dois minutos, praticamente não houve considerável denudação endotelial, aspecto já notado com distensões de 300 mmHg (CHESTER *et al.*, 1998). Stigler *et al.*, por sua vez, ilustraram que segmentos de VSM distendidos a 100 mmHg já apresentavam perda de aproximadamente 50% das células endoteliais em comparação a segmentos não-distendidos, enquanto o uso de pressões de 300 mmHg já ocasionou perda de 75 a 90% da camada endotelial, com estímulo precoce à proliferação da camada íntima outro fator relacionado a fisiopatologia da doença do enxerto venoso (STIGLER *et al.*, 2012).

Os efeitos da distensão não se restringem ao endotélio. Ao serem distendidas, as células musculares lisas da camada média destes vasos reduzem sua quantidade de adenosina trifosfato, o que seria indicativo de dano metabólico a estas células (CALISKAN *et al.*, 2019; GOOCH *et al.*, 2018). Além disto, há maior recrutamento de moléculas pró-inflamatórias e pró-trombóticas para o lúmen vascular, corroborando para formação precoce de trombos e possível oclusão do enxerto (TINELI *et al.*, 2007).

Esses fatores acima mencionados ilustram a relevância de se buscar um controle da pressão de distensão luminal da VSM durante a CRM. Distensões manuais, ainda que

cautelosas, podem fazer com que pressões de até 400 mmHg sejam atingidas, ocasionando dano endotelial considerável aos enxertos, além de reduzir sua elasticidade e capacidade de regeneração tecidual (TINELI *et al.*, 2007; WISE *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2007). Uso de sistemas manometrados, para buscar distensão de até 100 mmHg seriam os mais recomendáveis (CALISKAN *et al.*, 2019). Outra opção seria a adoção da técnica *no-touch*, na qual a VSM é excisada com o tecido perivascular, sem distensão sob pressão, resultando em maior preservação endotelial, com resultados clínicos em longo prazo similares até aqueles verificados com o uso da ATIE (DASHWOOD *et al.*, 2009; SAMANO *et al.*, 2015).

No estudo desta dissertação, ilustram-se as alterações morfológicas no endotélio de segmentos de VSM submetidos a diferentes metodologias de preparo, utilizando-se solução de cloreto de sódio a 0,9% ou SAH, ambos em temperatura ambiente, como soluções de preservação dos enxertos, além de diferentes pressões de distensão. Dessa forma, avaliamos de maneira mais sistemática os efeitos desses dois fatores, solução de preservação e pressão de distensão, sobre o endotélio venoso.

Com relação ao impacto das soluções de preservação sobre a ultraestrutura endotelial, notou-se que, o uso de SF como meio de conservação da VSM resultou em dano endotelial significativamente maior que aquele verificado no grupo controle ($P < 0,001$) e nos grupos conservados com SAH distendidos a pressão de 30 mmHg ($P < 0,01$), de 100 mmHg ($P < 0,001$) ($P < 0,001$), sendo o uso de SAH, portanto, fator protetor ao endotélio neste aspecto morfológico. Sob pressões de 300 mmHg apesar de haver tendência a maior dano com uso de SF, não houve diferença estatisticamente significativa, com segmentos de VSM preservados com ambas as soluções apresentando elevado grau de injúria endotelial.

A pressão de distensão também foi fator relacionado a dano endotelial, sendo este significativamente mais importante, quanto maior a pressão utilizada. Ou seja, segmentos distendidos a pressão de 100 mmHg apresentaram dano significativamente superior ($P < 0,001$) àqueles distendidos com pressão de 30 mmHg, e segmentos distendidos a 300 mmHg apresentaram dano consideravelmente maior ($P < 0,001$) que aqueles distendidos com pressões inferiores com a mesma solução de preservação.

Este estudo apresenta algumas limitações dignas de nota. Inicialmente, ressalta-se que se avaliou apenas o aspecto morfológico da camada endotelial da VSM quando esta é exposta a diferentes soluções de preservação e pressões de distensão, não podendo ser contemplados,

com o método utilizado, dados sobre a funcionalidade celular e expressão de marcadores de dano celular. Além disso, o tempo de exposição do enxerto venoso às respectivas pressões de distensão de cada grupo, vinte minutos, não reflete o que acontece na prática cirúrgica, uma vez que os segmentos venosos são expostos por tempos consideravelmente menores. Ressalta-se, contudo, que não há dados robustos na literatura sobre os efeitos do tempo de distensão sobre o endotélio venoso, bem como que esse tempo era necessário para que a fixação tecidual ocorresse, de modo a permitir análise fidedigna por MEV.

Em suma, neste estudo observou-se o efeito da exposição do endotélio da VSM a dois fatores habitualmente presentes no preparo deste conduto venoso para uso em cirurgias vasculares e cardiovasculares, os quais interferem diretamente na integridade deste tecido, a pressão de distensão, e a solução de preservação. Evidenciou-se maior dano ao endotélio quando pressões acima de 30 mmHg são utilizadas na distensão deste enxerto, bem como ilustrou-se que o uso de SAH como meio de preservação pode ser fator protetor para as células endoteliais. Com estes dados, espera-se que as metodologias para preparo cirúrgico da VSM possam ser modificadas, de modo a melhor preservar o endotélio venoso, o que pode resultar em melhores resultados clínicos a longo prazo para os pacientes submetidos a estes procedimentos cirúrgicos. Outros estudos avaliando o impacto destes mesmos fatores na funcionalidade das células endoteliais, bem como utilizando outras metodologias para análise dos segmentos venosos podem trazer novas informações acerca do tema estudado, ilustrando melhores métodos para manejo intraoperatório de enxertos venosos.

7. CONCLUSÃO

O dano estrutural ao endotélio de segmentos de VSM aumenta com o aumento da pressão de distensão independente do meio de preservação. Ademais, o uso de SF como solução resulta em maior dano estrutural em comparação a sua preservação com SAH para pressões até 100 mmHg, sendo o uso desta solução fator protetor ao endotélio.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. M.; WIELAND, S.; AUSTEN, W. G. Structural changes during preparation of autogenous venous grafts. **Surgery**, v. 76, n. 6, p. 1031-1040, 1974.

ACINAPURA, A. J. *et al.* The effect of local vascular trauma on fibrinolysis. **The American surgeon**, v. 32, n. 11, p. 762, 1966.

ALDEA, G. S. *et al.* The Society of Thoracic Surgeons clinical practice guidelines on arterial conduits for coronary artery bypass grafting. **The Annals of thoracic surgery**, v. 101, n. 2, p. 801-809, 2016.

ANGELINI, G. D. *et al.* Nature and pressure dependence of damage induced by distension of human saphenous vein coronary artery bypass grafts. **Cardiovascular research**, v. 21, n. 12, p. 902-907, 1987.

ANGELINI, G. D.; NEWBY, A. C. The future of saphenous vein as a coronary artery bypass conduit. 1989.

BAEYENS, N. *et al.* Endothelial fluid shear stress sensing in vascular health and disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 3, p. 821-828, 2016.

BEN ALI, W.; BOUHOUT, I.; PERRAULT, L. P. The effect of storage solutions, gene therapy, and antiproliferative agents on endothelial function and saphenous vein graft patency. **Journal of cardiac surgery**, v. 33, n. 5, p. 235-242, 2018.

BISWAS, K. S. *et al.* Multi-photon microscopy in the evaluation of human saphenous vein. **Journal of Surgical Research**, v. 95, n. 1, p. 37-43, 2001.

BOGNER, A. *et al.* A history of scanning electron microscopy developments: towards “wet-STEM” imaging. **Micron**, v. 38, n. 4, p. 390-401, 2007.

BOYDE, A.; MACONNACHIE, E. Morphological correlations with dimensional change during SEM specimen preparation. **Scanning electron microscopy**, v. 4, p. 27-34, 1981.

BONCHEK, L. I. Prevention of endothelial damage during preparation of saphenous veins for bypass grafting. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 79, n. 6, p. 911-915, 1980.

BOUHOUT, I.; ALI, W.B.; PERRAULT, L. P.. The effect of storage solutions on endothelial function and saphenous vein graft patency. **Indian Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 34, n. 3, p. 258-265, 2018.

BUCCIARELLI, L. G. *et al.* Inflammatory stress in primary venous and aortic endothelial cells of type 1 diabetic mice. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 6, n. 4, p. 249-261, 2009.

BUSH JR, H. L. *et al.* The natural history of endothelial structure and function in arterialized vein grafts. **Journal of vascular surgery**, v. 3, n. 2, p. 204-215, 1986.

CAGGIATI, A.; BERGAN, J. J. The saphenous vein: derivation of its name and its relevant anatomy. **Journal of Vascular Surgery**, v. 35, n. 1, p. 172-175, 2002.

CAGGIATI, A.; RICCI, S. The caliber of the human long saphenous vein and its congenital variations. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 182, n. 2, p. 195-201, 2000.

CALISKAN, E. *et al.* Saphenous vein grafts in contemporary coronary artery bypass graft surgery. **Nature Reviews Cardiology**, p. 1-15, 2019.

CAMERON, A. A. C.; GREEN, G. E.; BROGNO, D. A.; THORNTON, J. Internal thoracic artery grafts: 20-year clinical follow-up. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 25, n. 1, p. 188-192, 1995.

CATINELLA, F. P. *et al.* The factors influencing early patency of coronary artery bypass vein grafts: correlation of angiographic and ultrastructural findings. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 83, n. 5, p. 686-700, 1982.

CHEN, S. *et al.* Microenvironment of saphenous vein graft preservation prior to coronary artery bypass grafting. **Interactive cardiovascular and thoracic surgery**, v. 28, n. 1, p. 71-78, 2019.

CHESTER, A. H. *et al.* Effect of peri-operative storage solution on the vascular reactivity of the human saphenous vein. **European journal of cardio-thoracic surgery**, v. 7, n. 8, p. 399-404, 1993.

CHESTER, A. H. *et al.* Structural, biochemical and functional effects of distending pressure in the human saphenous vein: implications for bypass grafting. **Coronary artery disease**, v. 9, n. 2, p. 143-151, 1998.

CHEUNG-FLYNN, J. *et al.* Limiting injury during saphenous vein graft preparation for coronary arterial bypass prevents metabolic decompensation. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2017.

CHEUNG-FLYNN, J. *et al.* Normal Saline solutions cause endothelial dysfunction through loss of membrane integrity, ATP release, and inflammatory responses mediated by P2X7R/p38 MAPK/MK2 signaling pathways. **PLoS one**, v. 14, n. 8, p. e0220893, 2019.

COLOMBO, P. C. *et al.* Peripheral venous congestion causes inflammation, neurohormonal, and endothelial cell activation. **European heart journal**, v. 35, n. 7, p. 448-454, 2014.

D'AGOSTINO, R.S. *et al.* The Society of Thoracic Surgeons adult cardiac surgery database: 2018 update on outcomes and quality. **The Annals of thoracic surgery**, v. 105, n. 1, p. 15-23, 2018.

DASHWOOD, M. R. *et al.* Retaining perivascular tissue of human saphenous vein grafts protects against surgical and distension-induced damage and preserves endothelial nitric oxide synthase and nitric oxide synthase activity. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 138, n. 2, p. 334-340, 2009.

DAVIES, M.G.; HAGEN, P. Pathophysiology of vein graft failure: a review. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 9, n. 1, p. 7-18, 1995.

DE VRIES, M. R. *et al.* Vein graft failure: from pathophysiology to clinical outcomes. **Nature Reviews Cardiology**, v. 13, n. 8, p. 451, 2016.

DEB, S. *et al.* SUPERIOR SVG: no touch saphenous harvesting to improve patency following coronary bypass grafting (a multi-Centre randomized control trial, NCT01047449). **Journal of cardiothoracic surgery**, v. 14, n. 1, p. 85, 2019.

DELA PAZ, N. G.; D'AMORE, Patricia A. Arterial versus venous endothelial cells. **Cell and tissue research**, v. 335, n. 1, p. 5-16, 2009.

DENTON, Timothy A. *et al.* Radial artery harvesting for coronary bypass operations: neurologic complications and their potential mechanisms. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 121, n. 5, p. 951-956, 2001.

DOBRIN, P. B.; LITTOOY, F. N.; ENDEAN, E. D. Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts. **Surgery**, v. 105, n. 3, p. 393-400, 1989.

DOENST, T. *et al.* PCI and CABG for treating stable coronary artery disease: JACC review topic of the week. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 73, n. 8, p. 964-976, 2019.

EICHMANN, A. *et al.* Vascular development: from precursor cells to branched arterial and venous networks. **International Journal of Developmental Biology**, v. 49, n. 2-3, p. 259-267, 2003.

ERIKSSON, E. E. *et al.* Powerful inflammatory properties of large vein endothelium in vivo. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 25, n. 4, p. 723-728, 2005.

FAVALORO, R. G. Saphenous vein autograft replacement of severe segmental coronary artery occlusion: operative technique. **The Annals of thoracic surgery**, v. 5, n. 4, p. 334-339, 1968.

FAVALORO, R. G. Surgical treatment of coronary arteriosclerosis by the saphenous vein graft technique: critical analysis. **American Journal of Cardiology**, v. 28, n. 4, p. 493-495, 1971.

FERNANDEZ, F. G. *et al.* The Society of Thoracic Surgeons National Database 2019 Annual Report. **The Annals of thoracic surgery**, v. 108, n. 6, p. 1625-1632, 2019.

FLECK, R. A.; HUMBEL, B. M. (Ed.). **Biological Field Emission Scanning Electron Microscopy**. John Wiley & Sons, 2019.

FISS, D. M. Normal coronary anatomy and anatomic variations. **Applied Radiology**, v. 36, 2007.

FOUQUET, O. *et al.* Do storage solutions protect endothelial function of arterialized vein graft in an experimental rat model?. **Journal of Cardiothoracic Surgery**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2020.

GANDA, A. *et al.* Venous congestion and endothelial cell activation in acute decompensated heart failure. **Current heart failure reports**, v. 7, n. 2, p. 66-74, 2010.

GARRETT, H. Edward; DENNIS, Edward W.; DEBAKEY, Michael E. Aortocoronary bypass with saphenous vein graft: seven-year follow-up. **Jama**, v. 223, n. 7, p. 792-794, 1973.

GAUDINO, M. *et al.* Arterial grafts for coronary bypass: A critical review after the publication of ART and RADIAL. **Circulation**, v. 140, n. 15, p. 1273-1284, 2019.

GLAESER, R. M. Limitations to significant information in biological electron microscopy as a result of radiation damage. **Journal of ultrastructure research**, v. 36, n. 3-4, p. 466-482, 1971.

GLOVICZKI, P. *et al.* (Ed.). **Handbook of venous and lymphatic disorders: Guidelines of the American venous forum**. CRC Press, 2017.

GOLLEDGE, J. *et al.* Arterial flow induces changes in saphenous vein endothelium proteins transduced by cation channels. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 19, n. 5, p. 545-550, 2000.

GOOCH, K. J. *et al.* Biomechanics and mechanobiology of saphenous vein grafts. **Journal of biomechanical engineering**, v. 140, n. 2, 2018.

GUNDRY, S. R. *et al.* Intraoperative trauma to human saphenous veins: scanning electron microscopic comparison of preparation techniques. **The Annals of thoracic surgery**, v. 30, n. 1, p. 40-47, 1980.

GUSIC, R. J. *et al.* Shear stress and pressure modulate saphenous vein remodeling *ex vivo*. **Journal of biomechanics**, v. 38, n. 9, p. 1760-1769, 2005.

HAGUENAU, F. *et al.* Key events in the history of electron microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, v. 9, n. 2, p. 96-138, 2003.

HAJAR, R. Risk factors for coronary artery disease: historical perspectives. **Heart views: the official journal of the Gulf Heart Association**, v. 18, n. 3, p. 109, 2017.

HARSKAMP, R. E. *et al.* Saphenous vein graft failure after coronary artery bypass surgery: pathophysiology, management, and future directions. **Annals of surgery**, v. 257, n. 5, p. 824-833, 2013.

HARSKAMP, R. E. *et al.* Vein graft preservation solutions, patency, and outcomes after coronary artery bypass graft surgery: follow-up from the PREVENT IV randomized clinical trial. **JAMA surgery**, v. 149, n. 8, p. 798-805, 2014.

HASSE, J. *et al.* Morphologic Studies in Saphenous Vein Grafts for Aorto-coronary Bypass Surgery Part II: Influence of a Pressure-limited Graft Dilatation. **The Thoracic and cardiovascular surgeon**, v. 29, n. 01, p. 38-40, 1981.

HASHIZUME, M. *et al.* Intimal response of saphenous vein to intraluminal trauma by simulated angioscopic insertion. **Journal of vascular surgery**, v. 5, n. 6, p. 862-868, 1987.

HAYAT, M. A. Glutaraldehyde: role in electron microscopy. **Micron and Microscopica Acta**, v. 17, n. 2, p. 115-135, 1986.

HEAD, S. J. *et al.* Coronary artery bypass grafting: part 1—the evolution over the first 50 years. **European heart journal**, v. 34, n. 37, p. 2862-2872, 2013.

HE, G. Arterial grafts for coronary artery bypass grafting: biological characteristics, functional classification, and clinical choice. **The Annals of thoracic surgery**, v. 67, n. 1, p. 277-284, 1999.

JAMES, T. N. Anatomy of the coronary arteries in health and disease. **Circulation**, v. 32, n. 6, p. 1020-1033, 1965.

JOSEPH, J. *et al.* Guidelines in review: Comparison of ESC and ACC/AHA guidelines for the diagnosis and management of patients with stable coronary artery disease. **Journal of Nuclear Cardiology**, v. 25, n. 2, p. 509-515, 2018.

KIM, Y. H. *et al.* No-touch saphenous vein harvesting may improve further the patency of saphenous vein composite grafts: early outcomes and 1-year angiographic results. **The Annals of thoracic surgery**, v. 103, n. 5, p. 1489-1497, 2017.

KLYACHKIN, M. L. *et al.* Hypercholesterolemia and experimental vein grafts: accelerated development of intimal hyperplasia and an increase in abnormal vasomotor function. **Journal of Surgical Research**, v. 54, n. 5, p. 451-468, 1993.

KOLESSOV, V. I. Mammary artery-coronary artery anastomosis as method of treatment for angina pectoris. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 54, n. 4, p. 535-544, 1967.

LAWRIE, G. M.; WEILBACHER, D. E.; HENRY, P. D. Endothelium-dependent relaxation in human saphenous vein grafts: effects of preparation and clinicopathologic correlations. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 100, n. 4, p. 612-620, 1990.

LIBBY, P.; THEROUX, P. Pathophysiology of coronary artery disease. **Circulation**, v. 111, n. 25, p. 3481-3488, 2005.

LOESCH, A.; DASHWOOD, M. R. Pedicled vein grafts in coronary operation: no-touch harvesting under pressure. **The Annals of thoracic surgery**, v. 105, n. 6, p. 1863, 2018.

LOGERFO, F. W.; HAUDENSCHILD, C. C.; QUIST, W. C. A clinical technique for prevention of spasm and preservation of endothelium in saphenous vein grafts. **Archives of Surgery**, v. 119, n. 10, p. 1212-1214, 1984.

LOHR, J. M.; MOUAWAD, N. J. Venous Anatomy, Development, and Variations. In: **Current Management of Venous Diseases**. Springer, Cham, 2018. p. 3-22.

LOOP, F. D.; LYTLE, B. W., COSGROVE, D. M., STEWART, R. W., GOORMASTIC, M., WILLIAMS, G. W.; GOLDING, L. A. R.; GILL, C. C.; TAYLOR, P. C.; SHELDON, W. C.; PROUDFIT, W. L. Influence of the internal-mammary-artery graft on 10-year survival and other cardiac events. **New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 1, p. 1-6, 1986.

- MACK, M.; GOPAL, A. Epidemiology, traditional and novel risk factors in coronary artery disease. **Heart Failure Clinics**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2016.
- MALAKAR, A. K. *et al.* A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 10, p. 16812-16823, 2019.
- MANN, J.; DAVIES, M. J. Mechanisms of progression in native coronary artery disease: role of healed plaque disruption. **Heart**, v. 82, n. 3, p. 265-268, 1999
- MARCOVECCHIO, E. **Dizionario etimologico storico dei termini medici**. Festina lente Ed, 1993.
- MARIN, M. L. *et al.* Saphenous vein biopsy: a predictor of vein graft failure. **Journal of vascular surgery**, v. 18, n. 3, p. 407-415, 1993.
- MARIN, M. L. *et al.* Human greater saphenous vein: histologic and ultrastructural variation. **Cardiovascular Surgery**, v. 2, n. 1, p. 56-62, 1994.
- MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, B. *et al.* Conduits used in coronary artery bypass grafting: a review of morphological studies. **Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 23, n. 2, p. 55-65, 2017.
- MCKAVANAGH, P. *et al.* Management and prevention of saphenous vein graft failure: a review. **Cardiology and therapy**, v. 6, n. 2, p. 203-223, 2017.
- MEDRANO-GRACIA, P. *et al.* A computational atlas of normal coronary artery anatomy. **EuroIntervention: journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology**, v. 12, n. 7, p. 845-854, 2016.
- MEHDIZADEH, K. A. *et al.* How to prepare biological samples and live tissues for scanning electron microscopy (SEM). 2014.
- MELLY, L *et al.* Fifty years of coronary artery bypass grafting. **Journal of thoracic disease**, v. 10, n. 3, p. 1960, 2018.
- MESCHER, A. L. **Junqueira's basic histology: text and atlas**. McGraw-Hill Education, 2018.
- MIGNEAULT, I. *et al.* Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **Biotechniques**, v. 37, n. 5, p. 790-802, 2004.
- MILLS, N. L. Physiologic and technical aspects of internal mammary artery coronary artery bypass grafts. **Modern techniques in surgery. Cardio-thoracic Surgery. Mt. Kisco NY: Futura**, p. 1-19, 1982.
- MILLS, N. L.; EVERSON, C. T. Vein graft failure. **Current opinion in cardiology**, v. 10, n. 6, p. 562-568, 1995.
- MILROY, C. M. *et al.* Histological appearances of the long saphenous vein. **The Journal of pathology**, v. 159, n. 4, p. 311-316, 1989.

MITRA, A. K.; GANGAHAR, D. M.; AGRAWAL, D. K. Cellular, molecular and immunological mechanisms in the pathophysiology of vein graft intimal hyperplasia. **Immunology and cell biology**, v. 84, n. 2, p. 115-124, 2006.

MOHAMMED, A.; ABDULLAH, A. Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review. In: **Proceedings of 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics–Hervex**. 2019.

MOHR, F. W. *et al.* Coronary artery bypass graft surgery versus percutaneous coronary intervention in patients with three-vessel disease and left main coronary disease: 5-year follow-up of the randomised, clinical SYNTAX trial. **The Lancet**, v. 381, n. 9867, p. 629-638, 2013.

MOTWANI, J. G.; TOPOL, E. J. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. **Circulation**, v. 97, n. 9, p. 916-931, 1998.

MOZES, G.; GLOVICZKI, P. New discoveries in anatomy and new terminology of leg veins: clinical implications. **Vascular and endovascular surgery**, v. 38, n. 4, p. 367-374, 2004.

MUELLER, R. L.; ROSENGART, Todd K.; ISOM, O. Wayne. The history of surgery for ischemic heart disease. **The Annals of thoracic surgery**, v. 63, n. 3, p. 869-878, 1997.

NABEL, E. G.; BRAUNWALD, E. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 1, p. 54-63, 2012.

NEUMANN, F. *et al.* 2018 ESC/EACTS guidelines on myocardial revascularization. **European Heart Journal**, v. 40, n. 2, p. 87-165, 2019.

NICHOLSON, C. P.; GLOVICZKI, P.. Embryology and development of the vascular system. **Vascular surgery: basic science and clinical correlations**. 2nd ed. Malden, MA: **Blackwell Publishing**, p. 3-18, 2005.

NIKLASON, L.; DAI, G. Arterial venous differentiation for vascular bioengineering. **Annual review of biomedical engineering**, v. 20, p. 431-447, 2018.

OATLEY, C. W. The early history of the scanning electron microscope. **Journal of Applied Physics**, v. 53, n. 2, p. R1-R13, 1982.

OCHSNER JR, A.; COLP JR, RC.; BURCH, G. E. Normal blood pressure in the superficial venous system of man at rest in the supine position. **Circulation**, v. 3, n. 5, p. 674-680, 1951.

ONG, A. TL *et al.* The SYnergy between percutaneous coronary intervention with TAXus and cardiac surgery (SYNTAX) study: design, rationale, and run-in phase. **American Heart Journal**, v. 151, n. 6, p. 1194-1204, 2006.

OWENS, C. D. Adaptive changes in autogenous vein grafts for arterial reconstruction: clinical implications. **Journal of vascular surgery**, v. 51, n. 3, p. 736-746, 2010.

PANETTA, T. F. *et al.* Unsuspected preexisting saphenous vein disease: an unrecognized cause of vein bypass failure. **Journal of vascular surgery**, v. 15, n. 1, p. 102-112, 1992.

PAWLEY, J.; SCHATTEN, H. (Ed.). **Biological low-voltage scanning electron microscopy**. Springer Science & Business Media, 2007.

PIEGAS, L. S.; BITTAR, O. J.; NOGUEIRA, V.; HADDAD, N. Cirurgia de Revascularização Miocárdica. Resultados do Sistema Único de Saúde. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** v.93, n.5, p. 555-560, 2009.

REHFELD, Anders; NYLANDER, Malin; KARNOV, Kirstine. **Compendium of Histology: A Theoretical and Practical Guide**. Springer, 2017.

RIBATTI, D. Morphofunctional Aspects of Endothelium. In: **Systemic Vasculitides: Current Status and Perspectives**. Springer, Cham, 2016. p. 3-8.

ROSE, A. The sensitivity performance of the human eye on an absolute scale. **JOSA**, v. 38, n. 2, p. 196-208, 1948.

SABISTON JR, David C. The development of surgery of the coronary circulation: the Bigelow Lecture. **Annals of surgery**, v. 226, n. 2, p. 153, 1997.

SAMANO, N. *et al.* The no-touch saphenous vein for coronary artery bypass grafting maintains a patency, after 16 years, comparable to the left internal thoracic artery: a randomized trial. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 150, n. 4, p. 880-888, 2015.

SAMANO, N.; DASHWOOD, M.; SOUZA, D. No-touch vein grafts and the destiny of venous revascularization in coronary artery bypass grafting—a 25th anniversary perspective. **Annals of cardiothoracic surgery**, v. 7, n. 5, p. 681, 2018.

SANDNER, S. *et al.* Endothelial damage inhibitors for improvement of saphenous vein graft patency in coronary artery bypass grafting: current evidence, clinical challenges and future directions. **Minerva Cardioangiologica**, 2020.

SERRUYS, P. W. *et al.* Assessment of the SYNTAX score in the Syntax study. **EuroIntervention**, v. 5, n. 1, p. 50-56, 2009.

SCHATTEN, H. Low voltage high-resolution SEM (LVHRSEM) for biological structural and molecular analysis. **Micron**, v. 42, n. 2, p. 175-185, 2011.

SCHATTEN, H. (Ed.). **Scanning electron microscopy for the life sciences**. Cambridge University Press, 2012.

SHARONY, R. *et al.* Matrix metalloproteinase expression in vein grafts: role of inflammatory mediators and extracellular signal-regulated kinases-1 and-2. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 4, p. H1651-H1659, 2006.

STICK, C.; HIEDL, U.; WITZLEB, E. Venous pressure in the saphenous vein near the ankle during changes in posture and exercise at different ambient temperatures. **European journal of applied physiology and occupational physiology**, v. 66, n. 5, p. 434-438, 1993.

STIGLER, R. *et al.* The impact of distension pressure on acute endothelial cell loss and neointimal proliferation in saphenous vein grafts. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 42, n. 4, p. e74-e79, 2012.

SWIFT, M. R.; WEINSTEIN, B. M. Arterial-venous specification during development. **Circulation research**, v. 104, n. 5, p. 576-588, 2009.

TAGGART, D. P. Current status of arterial grafts for coronary artery bypass grafting. **Annals of cardiothoracic surgery**, v. 2, n. 4, p. 427, 2013.

THIENE, G. *et al.* Histological survey of the saphenous vein before its use as autologous aortocoronary bypass graft. **Thorax**, v. 35, n. 7, p. 519-522, 1980.

THOURANI, V. H. *et al.* The Society of Thoracic Surgeons Adult Cardiac Surgery Database: 2019 Update on Research. **The Annals of thoracic surgery**, v. 108, n. 2, p. 334-342, 2019.

THUIJS, D. JFM *et al.* Percutaneous coronary intervention versus coronary artery bypass grafting in patients with three-vessel or left main coronary artery disease: 10-year follow-up of the multicentre randomised controlled SYNTAX trial. **The Lancet**, v. 394, n. 10206, p. 1325-1334, 2019.

TINELI, R. A. *et al.* Mechanical forces and human saphenous veins: coronary artery bypass graft implications. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 22, n. 1, p. 87-95, 2007.

TOUMPOULIS, I.K., THEAKOS N., DUNNING J. "Does bilateral internal thoracic artery harvest increase the risk of mediastinitis?." **Interact Cardiovasc Thorac Surg** 2007; 6.6: 787-791.

TSAKOK, M.; MONTGOMERY-TAYLOR, S.; TSAKOK, T. Storage of saphenous vein grafts prior to coronary artery bypass grafting: is autologous whole blood more effective than saline in preserving graft function?. **Interactive cardiovascular and thoracic surgery**, v. 15, n. 4, p. 720-725, 2012.

UHL, J. F.; GILLOT, C. Embryology and three-dimensional anatomy of the superficial venous system of the lower limbs. **Phlebology**, v. 22, n. 5, p. 194-206, 2007.

UL-HAMID, A. **A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy**. Springer, 2018.

VASILAKIS, V. *et al.* Human saphenous vein and coronary bypass surgery: scanning electron microscopy of conventional and 'no-touch' vein grafts. **Vascular Disease Prevention**, v. 1, n. 2, p. 133-139, 2004.

VIARO, F. *et al.* Immunohistochemical evaluation of three nitric oxide synthase isoforms in human saphenous vein exposed to different degrees of distension pressures. **Cardiovascular Pathology**, v. 19, n. 6, p. e211-e220, 2010.

VINEBERG, A.; MILLER, G. Treatment of coronary insufficiency. **Canadian Medical Association Journal**, v. 64, n. 3, p. 204, 1951.

WARD, A. O. *et al.* Activation and inflammation of the venous endothelium in vein graft disease. **Atherosclerosis**, v. 265, p. 266-274, 2017.

WEISS, D. R. *et al.* Extensive deendothelialization and thrombogenicity in routinely prepared vein grafts for coronary bypass operations: facts and remedy. **International Journal of**

Clinical and Experimental Medicine, v. 2, n. 2, p. 95, 2009.

WILBRING, M. *et al.* Heparinized blood better preserves cellular energy charge and vascular functions of intraoperatively stored saphenous vein grafts in comparison to isotonic sodium-chloride-solution. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 55, n. 4, p. 445-455, 2013.

WILLIAMS, J. B. *et al.* The preservation and handling of vein grafts in current surgical practice: findings of a survey among cardiovascular surgeons of top-ranked US hospitals. **JAMA surgery**, v. 150, n. 7, p. 681-683, 2015.

WINKLER, B. *et al.* Graft preservation solutions in cardiovascular surgery. **Interactive cardiovascular and thoracic surgery**, v. 23, n. 2, p. 300-309, 2016.

WISE, E. S. *et al.* Preservation solution impacts physiologic function and cellular viability of human saphenous vein graft. **Surgery**, v. 158, n. 2, p. 537-546, 2015.

WISE, E. S.; BROPHY, C. M. The case for endothelial preservation via pressure-regulated distension in the preparation of autologous saphenous vein conduits in cardiac and peripheral bypass operations. **Frontiers in surgery**, v. 3, p. 54, 2016.

WISE, E. S. *et al.* Unregulated saphenous vein graft distension decreases tissue viscoelasticity. **Perfusion**, v. 32, n. 6, p. 489-494, 2017.

WINDECKER, S. *et al.* Considerations for the choice between coronary artery bypass grafting and percutaneous coronary intervention as revascularization strategies in major categories of patients with stable multivessel coronary artery disease: an accompanying article of the task force of the 2018 ESC/EACTS guidelines on myocardial revascularization. **European heart journal**, v. 40, n. 2, p. 204-212, 2019.

WINKLER, B. *et al.* Graft preservation solutions in cardiovascular surgery. **Interactive cardiovascular and thoracic surgery**, v. 23, n. 2, p. 300-309, 2016.

WOODWARD, L.C.; ANTONIADES, C.; TAGGART, D.P. Intraoperative vein graft preservation: what is the solution?. **The Annals of thoracic surgery**, v. 102, n. 5, p. 1736-1746, 2016.

WOOLLARD, H. H. The development of the principal arterial stems in the forelimb of the pig. **Contrib Embryol**, v. 14, p. 139-154, 1922.

ZAKKAR, M.; D'ANGELINI, G.; EMANUELI, C. Regulation of vascular endothelium inflammatory signalling by shear stress. **Current vascular pharmacology**, v. 14, n. 2, p. 181-186, 2016.

ZERKOWSKI, H. R. *et al.* Endothelial damage of the venous graft in CABG. **European journal of cardio-thoracic surgery**, v. 7, n. 7, p. 376-382, 1993.

ZHAO, J. *et al.* Manual pressure distension of the human saphenous vein changes its biomechanical properties—implication for coronary artery bypass grafting. **Journal of biomechanics**, v. 40, n. 10, p. 2268-2276, 2007.

ZHOU, W. *et al.* Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). In: **Scanning microscopy for nanotechnology**. Springer, New York, NY, 2006. p. 1-40.

ANEXO – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise ultraestrutural da veia safena magna na cirurgia de revascularização do miocárdio.

Pesquisador: José Glauco Lobo Filho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 69936317.9.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Cirurgia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.257.035

Apresentação do Projeto:

Serão escolhidos para participar do estudo vinte pacientes portadores de DAC com indicação cirúrgica, que serão submetidos a CRM com uso de enxertos de VSM para revascularização miocárdica. Somente poderão ser incluídos no estudo segmentos venosos cujas avaliações por ultrassonografia pré-operatória e por visualização direta intraoperatória demonstrem ausência de varicosidades ou de refluxo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo deste trabalho é avaliar, por meio da microscopia eletrônica de varredura, a anatomia ultraestrutural de segmentos de VSM sob diferentes condições de preservação e preparo na CRM.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar a anatomia ultraestrutural da VSM com uso da microscopia eletrônica de varredura;
2. Avaliar as diferenças na anatomia ultraestrutural da VSM resultantes da preservação desta veia em solução salina ou em solução sanguínea, comparando os achados com uso da microscopia eletrônica de varredura;
3. Avaliar as diferenças na anatomia ultraestrutural da VSM resultantes da distensão desta veia com uso solução salina ou de solução sanguínea, comparando os achados com uso da microscopia

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Município: FORTALEZA

CEP: 60.430-275

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 2.257.035

eletrônica de varredura;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A exérese de segmentos de VSM será somente realizada em pacientes com recomendação cirúrgica para excisão e uso destes enxertos. Durante a CRM, por segurara, a remoção do segmento venoso sempre é maior que o necessário para a confecção dos enxertos, uma vez que há, a depender da anatomia coronariana, necessidade de maior ou menor extensão da VSM, aspecto este avaliado com precisão apenas durante o período intraoperatório. Os segmentos de VSM que serão utilizados no estudo, necessariamente são os excedentes cirúrgicos. A solução salina, e a solução sanguínea utilizadas são as descritas e amplamente empregadas em diversos centros. Pelos motivos expostos, e pelo fato de que não haverá hiperdistensão dos segmentos venosos a serem utilizados, não há riscos específicos aos sujeitos da pesquisa em decorrência desta. Não haverá identificação do paciente após exérese dos segmentos de VSM.

Benefícios:

Não há benefícios diretamente ao paciente, embora os resultados possam promover a elaboração de técnicas aprimoradas para conservação e preparo da VSM na CRM.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para a área estudada, pois pretende avaliar o impacto das diferentes metodologias de preparo e exérese da VSM na CRM. Espera-se que VSM dissecadas com menor traumatismo e preservadas em solução sanguínea apresentem menor grau de dano endotelial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram devidamente apresentados. Conforme solicitado o pesquisador refez TCLE e incluiu anuência da Central Analítica da UFC.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Telefone: (85)3366-8344

CEP: 60.430-275

Município: FORTALEZA

E-mail: comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 2.257.035

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_932912.pdf	10/08/2017 20:34:18		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoInstituicao.pdf	10/08/2017 20:33:48	José Glauco Lobo Filho	Aceito
Outros	CartaCEP.pdf	10/08/2017 20:33:34	José Glauco Lobo Filho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_Central_Analitica_UFC.pdf	10/08/2017 20:29:06	José Glauco Lobo Filho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_NOVO.pdf	10/08/2017 20:28:19	José Glauco Lobo Filho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	13/06/2017 20:03:10	José Glauco Lobo Filho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermodeCompromisso.pdf	13/06/2017 20:02:55	José Glauco Lobo Filho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoConcordancia.pdf	13/06/2017 20:02:39	José Glauco Lobo Filho	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	13/06/2017 20:01:48	José Glauco Lobo Filho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 04 de Setembro de 2017

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

APÊNDICE – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

NOME DO PACIENTE: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____

SEXO: MASCULINO () FEMININO ()

DATA DE NASCIMENTO: _/_/_

ENDEREÇO: _____

NÚMERO: _____ APTO: _____ BAIRRO: _____

CIDADE: _____ CEP: _____

TELEFONE (COM DDD): (____) _____

RESPONSÁVEL LEGAL: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____

SEXO: MASCULINO () FEMININO ()

DATA DE NASCIMENTO: _/_/_

ENDEREÇO: _____

NÚMERO: _____ APTO: _____ BAIRRO: _____

CIDADE: _____ CEP: _____

TELEFONE (COM DDD): (____) _____

2. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

- TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Análise Ultraestrutural Da Veia Safena Magna Na Cirurgia De Revascularização Do Miocárdio
- PESQUISADOR: Matheus Duarte Pimentel
- CARGO/FUNÇÃO: Médico
- INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: CREMEC 19960
- AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA (probabilidade que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo): baixo risco
- DURAÇÃO DA PESQUISA: 12 meses

3. REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA

3.1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO DA PESQUISA: Esta pesquisa tem como objetivo analisar com uso de microscopia eletrônica, a anatomia de segmentos de veia safena magna sob diferentes condições de preservação e preparo na cirurgia de revascularização do miocárdio.

PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS E PROPÓSITOS: Durante a cirurgia de revascularização do miocárdio, segmentos de veias ou artérias são ligados da aorta ou de outras artérias, para as artérias coronárias, de modo a conduzir o sangue em quantidade adequada aos locais onde antes isto não ocorria. Dentre estes segmentos de vasos sanguíneos, a **veia safena magna**, que se localiza na parte interna da coxa, é o enxerto venoso mais utilizado.

Nesta cirurgia, usualmente a veia safena é removida de um dos membros inferiores, em comprimentos variáveis, a depender da necessidade cirúrgica. Após sua remoção, esta veia permanece armazenada em uma solução de soro fisiológico ou no sangue do próprio paciente, até que chegue o momento de seu uso nas artérias do coração.

Imediatamente após a remoção da veia, três porções menores (de 1 cm) da veia safena serão removidas, uma será conservada em recipiente estéril, outra porção em solução contendo soro fisiológico, e a última será mantida no sangue do próprio paciente. Após isso, seguindo os

procedimentos habituais da cirurgia, a veia safena magna será distendida com uso da solução em que foi preservada, escolhendo-se aleatoriamente o grupo que irá para o soro fisiológico e o grupo que irá ser mantido em sangue do próprio paciente.

Os segmentos de veia safena, serão então armazenados e enviados para a Central Analítica da Universidade Federal do Ceará, onde será realizado seu estudo com uso de microscopia eletrônica.

32 **DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS:** A remoção de segmentos de veia safena magna é procedimento padrão na cirurgia de revascularização do miocárdio quando há necessidade de revascularização de múltiplas artérias coronárias, ou quando o paciente não está apto ao uso de outros enxertos.

A remoção das porções de veia safena a serem utilizados nesta pesquisa não traz quaisquer desconfortos adicionais ao paciente. Durante a cirurgia de revascularização do miocárdio, por segurança, a remoção do segmento venoso sempre é maior que o necessário para a confecção dos enxertos, uma vez que há, a depender da anatomia coronariana, necessidade de maior ou menor extensão da veia. **Os segmentos de veia safena que serão utilizados no estudo, necessariamente são os excedentes cirúrgicos.** Pelos motivos expostos, e pelo fato de que não haverá traumatismo aos segmentos venosos a serem utilizados, não há riscos específicos aos sujeitos da pesquisa em decorrência desta. Não haverá identificação do paciente após remoção dos segmentos de veia safena.

4. ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

O paciente poderá ter acesso, a qualquer momento, à informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, e poderá também consultar o pesquisador (médico) para esclarecer eventuais dúvidas.

O paciente tem a liberdade de se recusar a continuar participando da pesquisa e de retirar seu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo algum à continuidade de sua assistência e acompanhamento médico. A privacidade do paciente é garantida e todos os dados e informações dadas ao pesquisador serão mantidos sob sigilo e confidencialidade.

Os dados obtidos serão utilizados somente nesse estudo e o só serão divulgados entre

estudiosos do assunto, sempre garantido a confidencialidade do paciente. O paciente não irá receber nenhum pagamento por participar desta pesquisa, nem haverá nenhum custo financeiro relacionado a essa pesquisa.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você. Caso haja danos decorrentes dos riscos previstos, o pesquisador assumirá a responsabilidade pelos mesmos.

5. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA

Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344/46. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

Pesquisador: Matheus Duarte Pimentel

Endereço: Rua José Lourenço 777, Bairro Aldeota. CEP: 60115-280 Telefone: (85) 32441711

DECLARO QUE, APÓS CONVENIENTEMENTE ESCLARECIDO PELO PESQUISADOR E TER ENTENDIDO O QUE ME FOI EXPLICADO, CONSINTO EM PARTICIPAR DO PRESENTE PROTOCOLO DE PESQUISA.

Fortaleza, ___ de _____ de _____

Assinatura (ou digital, caso não assine), do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Assinatura do Pesquisador