

Mário Osvaldo V. Peredo

## Ultra-estrutura dos enxertos autólogos de veia safena preservada em normotemia e hipotermia. Estudo histológico e eletromicroscópico das alterações imediatas e a curto prazo

*A veia safena autóloga é o substituto arterial mais usado nas cirurgias de revascularização coronária, periférica, renal e outras. Durante esses procedimentos, a veia safena é sujeita a períodos variáveis de isquemia, e a traumas cirúrgico e hidrostático. É evidente a importância de preservação estrutural desse substituto arterial, antes do implante propriamente dito.*

*Este estudo, que examina as alterações celulares imediatas e a curto prazo da veia safena autóloga do cão, antes e após o transplante dessa à artéria ilíaca ipsilateral, consiste em 30 implantes de veia safena autóloga realizados em 15 cães, usando como variáveis a temperatura e a solução de preservação. A técnica empregada foi idêntica. A solução para dilatação foi soro fisiológico ou sangue, arterial heparinizado, tendo essa solução à temperatura de 4°C ou 23°C (temperatura ambiente). Antes do implante, esses segmentos de veia foram estudados a intervalos regulares de 5 min até 120 min, usando-se a microscopia óptica e a microscopia eletrônica. Após o implante, a potência desses enxertos foi avaliada pelo método palpatório, Doppler e arteriográfico. Foram sacrificados 8 cães, de modo aleatório, no 7.º dia pós-operatório, e 22 cães foram seguidos durante 38 dias. A microscopia de luz e a eletromicroscopia: foram usadas para a análise celular desses segmentos transplantados.*

*O resultado deste estudo mostra a fragmentação severa do endotélio e da membrana basal, no grupo de veias preservadas em soro fisiológico. A preservação imediata e a curto prazo é superior, quando utilizado o sangue. A hipotermia (4°C) e sangue arterial heparinizado preservam a integridade celular antes do implante, diminuindo o dano celular imediato e a curto prazo da veia safena autóloga de cão.*

O trabalho experimental de Alexis Carrel<sup>1</sup> no início do século demonstrou que a veia poderia ser usada como substituto arterial; todavia, foi somente após os avanços da técnica em cirurgia vascular que o uso clínico se tornou rotineiro.

A primeira descrição de enxerto em posição femoral foi feita por Kunlin<sup>2</sup>, em 1948, seu uso em posição fêmoro-poplíteia foi preconizado por Linton e Darling<sup>3</sup>, em 1962.

Recentemente, com o avanço da revascularização coronária, tornou-se essencial o conhecimento profundo das alterações estruturais da veia safena antes do implante, e de métodos que possam preservar a sua integridade celular, objetivando, maior potência desses enxertos.

O estudo do comportamento celular dessas estruturas, usando como variáveis a temperatura e o meio de preservação, parecem-nos necessários.

O implante de veia safena, carente de suprimento sanguíneo e, até certo ponto, traumatizada, tem um comportamento biológico que dependerá de integridade celular para tornar-se viável ou substituída gradualmente por tecido fibroso. A viabilidade inicial desse conduto depende da integridade celular da sua capacidade de restabelecer a sua própria circulação capilar.

Este estudo visa à análise desses segmentos de veia, antes e a curto prazo (38 dias), após o implante.

### Material e métodos

As cirurgias foram realizadas em 15 cães adultos, com técnica, assepsia, segurança e métodos usados em humanos. Os cães foram anestesiados com tionembutal sódico, intubação orotraqueal e respiração controlada pelo res-

\*Trabalho realizado no Departamento de Pesquisa do Henry Ford Hospital, Detroit, Michigan, USA..

\* Médico do Prontocor, Belo Horizonte, MG.

pirador Bird. Após preparo asséptico do abdome e região coxo-femoral, segmentos de 6 em de comprimento de veia safena magna foram isolados usando técnica habitual, retirados e imediatamente imersos em sangue arterial heparinizado ou soro fisiológico, com temperatura de 23°C (meio ambiente) ou 4°C. Cada um desses segmentos foi biopsiado para estudo microscópico e eletromicroscópico (fig. 1).

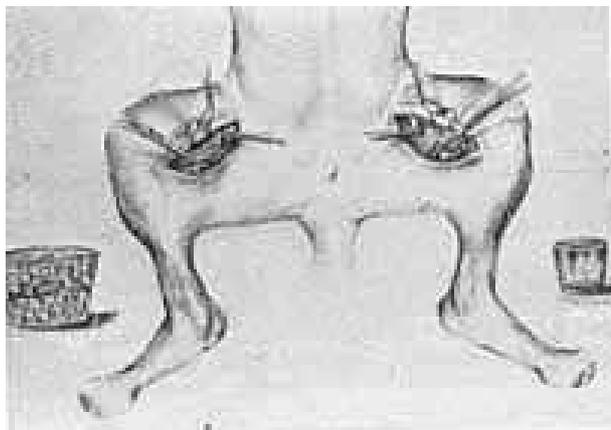


Fig. 1

Cada biopsia foi estudada antes do implante de acordo com o protocolo mostrado na tabela I. A biópsia de controle é retirada com a veia “in-situ” de cada espécime.

**Tabela I - Método de estudo antes do implante.**

I - Biópsias a 5, 30, 60 e 120 minutos.

II - Microscopia (embebidas em plástico, usando o corante dicromático).

III - Microscopia eletrônica (acetato de uracil & citrato de chumbo).

Completados os 60 min de preservação e previamente feita a exposição da aorta terminal e artérias ilíacas externas, é feito o implante da veia safena ipsilateral, usando a técnica vascular corrente (anastomose término terminal, fio prolene 5-0 e sutura contínua sem angustiar o lúmen do vaso), como mostra a figura 2. Após fechamento das feridas cirúrgicas, cobertas por curativo rotineiro, cada um desses cães foi estudado, seguindo o método exposto na tabela II.

**Tabela II - Método de estudo após o implante.**

I - Clínico (palpação da artéria femoral diária e uso do Dopler).

II - Radiográfico (arteriograma translombar).

III - Microscopia, de luz: hematoxilina e eosina E.A.O. (tecido elástico tricromo de Goimari (músculo liso).

IV - Microscopia, eletrônica (acetato de uracil & citrato de chumbo).

O segmento clínico para a avaliar a patência do enxerto foi feito mediante palpação e uso do Doppler unidirecional da Parks Eletronic's. Em ocasiões especiais foi feito o

arteriograma translombar. No 7.º dia pós-operatório foram sacrificados 4 cães (8 enxertos), sendo seguidos os 11 cães durante 38 dias, quando o estudo foi considerado completo. A tabela III mostra a patência de 30 enxertos de veia safena no 7.º dia pós-operatório, Observamos a patência de 100% dos enxertos com 7 dias, tendo sido constatada a patência clínica em 22 e, durante autópsias aleatórias, em 8. Cada um desses enxertos obtidos por autópsia a 7 dias foi estudado pela microscopia de luz e eletromicroscopia. (tab. II). Os demais enxertos (22) foram seguidos durante 38 dias; os cães sacrificados e os enxertos estudados seguindo o mesmo protocolo (tab. IV).

**Tabela III - 30 enxertos caninos autólogos de veias safena - patência, n.º 7.º - D.P.O.**

Patência clínica	Patência com autópsia	N.ºs de patência total	
		N.º	%
22	8	30	100

**Tabela IV - 22 enxertos autólogos de veia safena - patência no 38.º D.P.O.**

Método de preservação	N.º de enxertos	Estados dos enxertos a 38 dias	
		Patente	Ocluído
Soro fisiológico	23°C	6	1
	4°C	5	2
Sangue arterial heparinizado	23°C	5	4
	4°C	6	6
Total	22	13	9

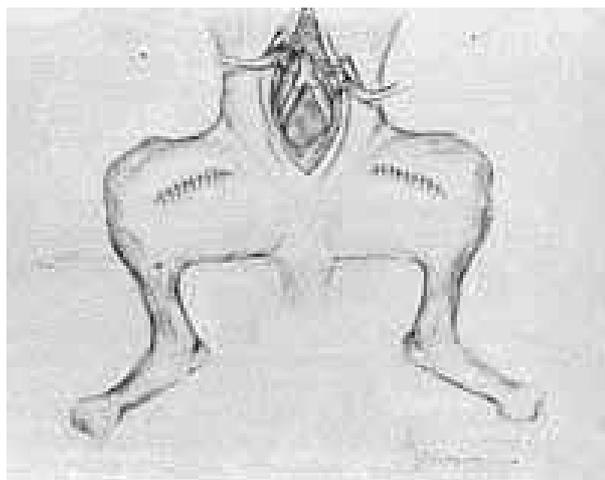


Fig. 2

**Resultados**

O estudo realizado mostra o estado de preservação da arquitetura celular destas veias em dois estágios. O 1.º, relacionado com a preservação antes do implante dos elementos em po-

sição arterial e o 2.º, as observações feitas no 7.º e 38.º dia. No 1.º estágio, os enxertos de veia safena foram examinados pela microscopia ótica, todavia, a informação total sobre o estado de preservação celular é melhor avaliada pela microscopia eletrônica.

As veias preservadas em soro fisiológico, veículo comumente usado durante este tipo de cirurgia, apresentaram as seguintes informações: 1) à temperatura ambiente (em soro fisiológico), já na 1.º biópsia em 5 min, o desarranjo celular é evidente, apresentando alterações severas e progressivas durante as biópsias repetidas com 30, 60 e 120 min; em todos os espécimes estudados, estas alterações são semelhantes com 5, 30 e 120 min; 2) o estudo eletromicroscópico, visto na figura 3, é protótipo do estudo celular, após a preservação em soro fisiológico à temperatura ambiente (23°C).

Observamos mudanças marcantes na preservação celular do endotélio e membrana basal. É notória a alta acumulação de lípidos no citoplasma celular e as células do músculo liso estão edemaciadas. Não há sequer indício de pinocitosis, significando inanição metabólica ou morte celular.

Na figura 4, o segmento de veia preservada em soro fisiológico à temperatura de 41°C apresenta: junção intercelular alterada ou afastamento intercelular (edema), discontinuidade da superfície endotelial, queda do endotélio, acúmulo de material lipídico no citoplasma celular endotelial, que reflete catabolismo aumentado, diminuição da pinocitosis. Na figura 5, notamos a veia safena preservada em sangue arterial à temperatura ambiente, mostrando mudanças leves, com predominância de uma boa arquitetura celular.

A superfície endotelial apresenta apenas algumas irregularidades. A membrana de base está intacta, as células do músculo liso têm aparência normal. Na figura 6, observamos a arquitetura celular de veia safena autóloga preservada em sangue arterial (à temperatura 4°C). Mostra uma aparência normal de contorno e integridade da superfície endotelial. A membrana de base é inteiramente visível, contínua e compacta. O citoplasma e núcleo celular têm aparência normal e a pinocitosis ativa presente



Fig. 3



Fig. 4

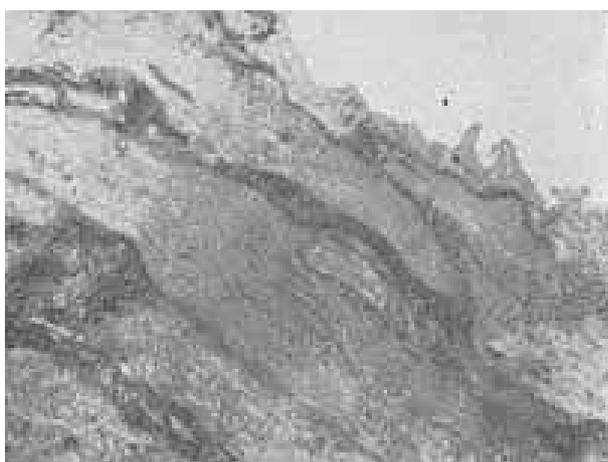


Fig. 5

reflete o transporte de energia que denota um metabolismo adequado.

No 2.º estágio, 7.º dia pós-operatório, foram estudados 8 espécimes de veia implantada, escolhidas de modo aleatório.

Do ponto de vista clínico e com o uso de Doppler, foi verificada a patência de todos os enxertos. Durante a exploração cirúrgica desses enxertos, foi observada dilatação do segmento venoso previamente preservado em soro fisiológico à temperatura ambiente, além da falta de vascularização da superfície externa do enxerto (correspondente à adventícia).

A figura 7 mostra o aspecto dilatado, equimótico, friável e perda de elasticidade do enxerto preservado em soro fisiológico (23°C) (parte superior da figura). A região inferior da figura mostra um enxerto preservado em sangue heparinizado e arterial a 4°C mostrando uma íntima brilhante, aspecto normal e preservação da elasticidade. Esses enxertos foram estudados pela microscopia de luz e podem ser observados do ponto de vista histológico na figura 8, que mostra uma composição de 4 figuras, sendo as superiores representativa preservação em soro fisiológico e as inferiores do sangue arterial heparinizado. O grupo superior mostra infiltrado difuso, polimorfolinfocítico. No canto superior direito há ausência de endotélio, diminuição de células musculares



Fig. 6

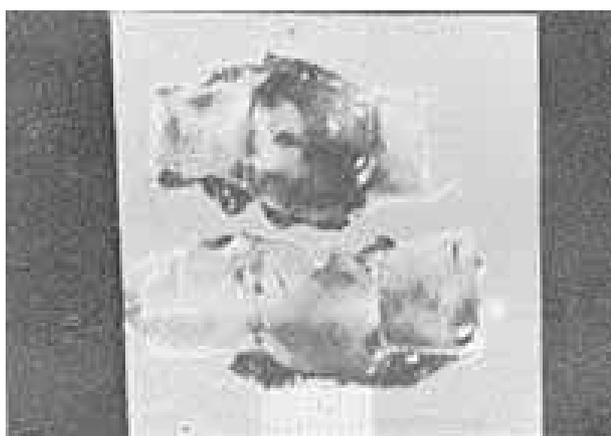


Fig.7

lisas e fibras elásticas; os exemplos histológicos inferiores (sangue arterial heparinizado) mostram endotélio intacto e apenas um leve infiltrado.

Com relação à patência dos 22 enxertos após 38 dias, notamos que o índice de oclusão no grupo de soro fisiológico é extremamente alto. Oito dos 11 enxertos, em contraste com o grupo de sangue arterial heparinizado, cuja patência é de 10 enxertos com apenas 1 oclusão. O estudo histológico desse grupo (a 38 dias) mostra na figura 9, na parte superior, os representativos de soro fisiológico; à esquerda (soro fisiológico 4°C), o endotélio presente, o músculo liso e tecido elástico hipotrófico, havendo infiltrado moderado; à direita (soro fisiológico 23°C), oclusão do lúmen do enxerto, endotélio ausente, o lúmen preenchido por tecido fibroso, havendo severa infiltração histiolifocitária da média e adventícia. Na parte inferior, à esquerda (sangue arterial heparinizado 4°C) a preservação é excelente; é evidente a hipertrofia do músculo liso; à direita, o endotélio, músculo liso e tecido elástico quase normal.

A microscopia eletrônica mostra nitidamente superfície lisa do endotélio dos enxertos preservados em sangue a 41°C (fig. 10), pequenos ninhos de hemácias nos espécimes de sangue arterial, à temperatura ambiente (fig. 11) e

enormes ninhos no endotélio dos enxertos preservados em soro fisiológico a 4°C (fig. 12).

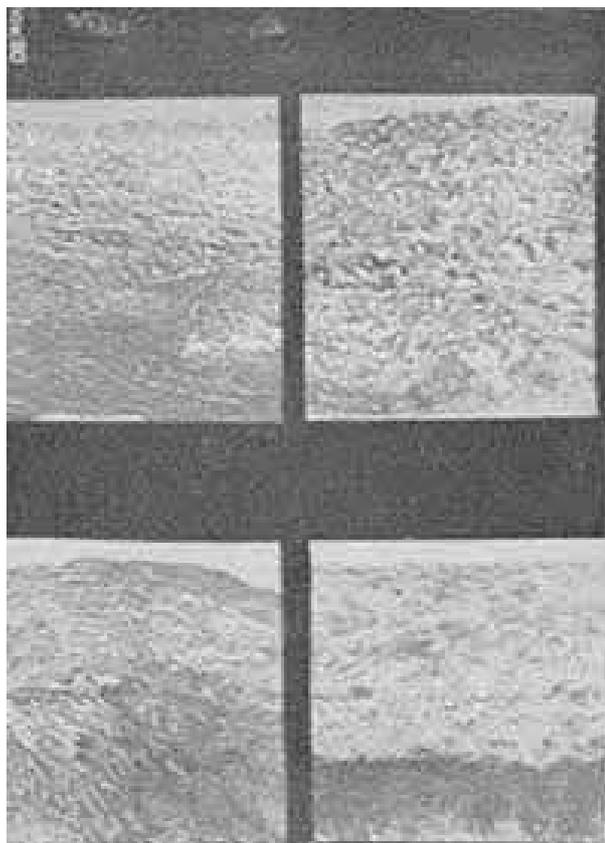


Fig. 8

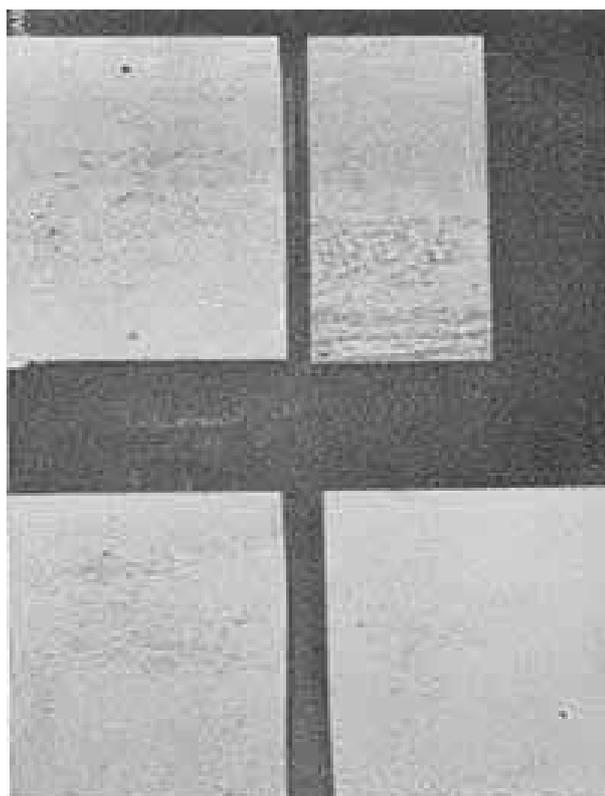


Fig. 9

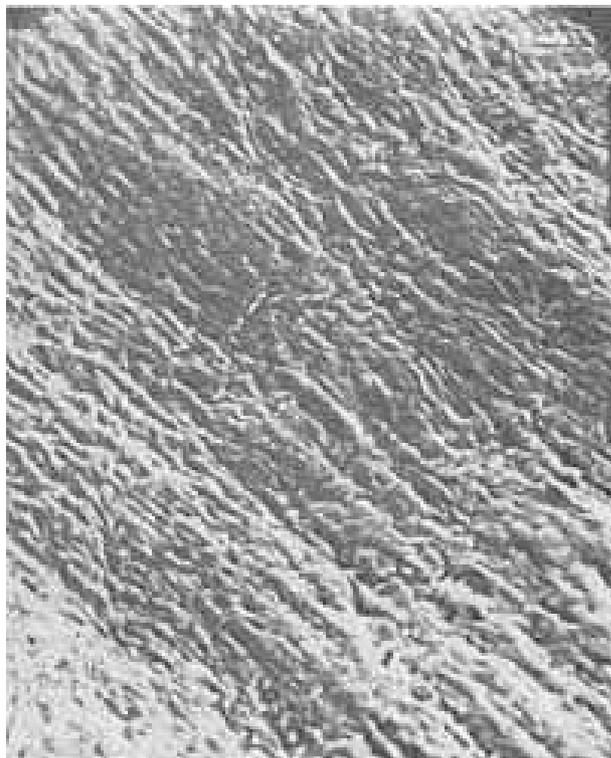


Fig. 10



Fig. 11

## Discussão

O comportamento biológico dos enxertos autólogos de veia safena do cão tem sido pouco estudado, embora os achados possam ser extrapolados de certo modo à veia safena humana. Na literatura pesquisada, este nos parece



Fig. 12

ser o único estudo de alterações celulares ocorridas antes do implante. Os insultos celulares a que essas estruturas estão expostas durante período variável, que depende do tipo de cirurgia, justifica este trabalho, que demonstra a superioridade da preservação dessas estruturas em sangue arterial heparinizado a 4°C.

Do ponto de vista histológico, os estudos feitos em enxertos autólogos humanos, em posição fêmoro-poplíteia e outras, por Szilagyí <sup>4</sup>, em 1964, apontam como fatores responsáveis pela obstrução do enxerto imediata e tardia, erros técnicos, estágio avançado das lesões e comportamento do enxerto. Esse último não é menos importante e a preservação adequada da veia é essencial. Os estudos da circulação capilar da parede da veia, realizados por Wiatts <sup>5</sup> em 1962, demonstram a necessidade de ser feita a colheita da veia safena de modo altamente técnico e com o menor trauma possível, devendo esse procedimento ser realizado por elemento experiente. O excesso de tecido conectivo e adiposo da adventícia da veia deve ser retirado para facilitar o contato dessa estrutura com seu novo meio ambiente, evitando os hematomas na parede da veia para um pronto restabelecimento da circulação na “vasa vasorum”, a exemplo do que acontece com enxertos de pele.

Não há dúvida que o segmento de veia safena a ser transplantado deve persistir como tecido vivo, sem detrimento de seus elementos endoteliais, musculares e elásticos. A prevenção do dano endotelial, durante a preparação da veia safena autóloga humana, é motivo de recente artigo de Bonchek <sup>6</sup>, afirmando o efeito maléfico da distensão venosa hidrostática com pressões altas, além de ressaltar a importância da solução de preservação.

Desde 1972, estamos convencidos de que o único veículo a ser usado na preservação da veia safena é o sangue heparinizado do próprio paciente, que é de fácil acesso em qualquer procedimento cardiovascular.

Os resultados deste trabalho demonstram que as soluções de soro fisiológico, como outras comumente encontradas no mercado cuja composição é semelhante, têm, pelas suas

propriedades de PH, composição eletrolítica, a característica de produzir desarranjo celular severo na arquitetura dessas estruturas, mesmo após 5 minutos.

Em conclusão, observamos a fragmentação do endotélio e membrana de base, no grupo de veias tratadas com soro fisiológico; a preservação estrutural adequada foi obtida usando o sangue arterial heparinizado (preservação imediata e a curto prazo); a hipotermia (4°C) e o sangue arterial heparinizado foram responsáveis pela melhor preservação celular, imediata e a curto prazo do enxerto safeno autólogo do cão.

### Summary

The ambient temperature and the nature of the storage fluid may well have significant effects on the transplantation of venous auto-grafts.

Experimental conditions have been set to approximate actual operating room procedures. Saphenous veins from dogs were used as models in the experiments. After removal, the veins were kept for two hours under four different conditions, either at 4°C or 23° C in both physiological saline or arterial blood. At the end of one hour they were prepared for light microscopy and electron microscopy studies; studies were also made after implantation lasting 7 and 38 days. The veins kept in saline prior to implantation

showed progressive sloughing of endothelium. and its separation from the basement membrane occurred to such a degree that many areas were completely devoid of endothelial cells. There was cytological degeneration and disruption of the organelles. By contrast the veins kept for one hour in heparinized arterial blood, at 4°C, were well preserved.

The conclusion is that the saline group showed: 1) disruption of the endothelium and basement membrane, occurring progressively over 120 minutes; 2) best results, in vein preservation (immediate and short term) were noted in those kept in arterial blood; 3) hypothermia and heparinized arterial blood minimized acute and short term histologic changes of the canine autogenous grafts.

### Referências

1. Carrel, A. - La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères. Lyon med. 98: 859, 1902.
2. Kunlin, J. - Le traitement de l'ischémie aortique par la graffe veineuse longue. Rev. Chir. 70: 206, 1951.
3. Linton, R. R.; Darling, R. C. - Autogenous saphenous vein bypass grafts in femoro-popliteal obliterative arterial disease. Surgery, 51: 62, 1962.
4. Szilagyi, D. E. - Discussion on choice of vascular graft material for patients. In Wesolowski, S. A.; Dennis, C. - Fundamentals of Vascular Grafting. Macgraw-Hill Book Co., Inc. New York, 1963. p. 397.
5. Wyatt, A P. - The vascularization of vein grafts. Br. J. Surg. 51: 378, 1964.
6. Bonchek, L. I. - Prevention of endothelial damage during preparation of saphenous veins for bypass grafting. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 79: 911, 1980.