

# Forças mecânicas e veias safenas humanas: implicação na revascularização do miocárdio

*Mechanical forces and human saphenous veins: coronary artery bypass graft implications*

Rafael Angelo TINELI<sup>1</sup>, Fernanda VIARO<sup>2</sup>, Marcelo Bellini DALIO<sup>3</sup>, Graziela Saraiva REIS<sup>4</sup>, Solange BASSETO<sup>5</sup>, Walter Villela de Andrade VICENTE<sup>6</sup>, Alfredo José RODRIGUES<sup>7</sup>, Paulo Roberto Barbosa EVORA<sup>8</sup>

RBCCV 44205-873

## Resumo

As células endoteliais vasculares estão expostas a uma variedade de forças mecânicas *in vivo*, resultantes do fluxo sanguíneo pulsátil. Dentre essas forças, destacam-se: forças de cisalhamento, tangenciais à parede do vaso, produzidas pelo atrito com o fluxo sanguíneo viscoso, tensão de complacência da parede vascular e a pressão hidrostática do conteúdo sanguíneo no interior da vasculatura. Diversos autores estudaram as alterações hemodinâmicas, funcionais e morfológicas em veias safenas humanas causadas por esses tipos de forças com resultados conflitantes. A motivação dessa

revisão foi analisar dados da literatura e alguns dados experimentais do nosso laboratório. Os aspectos revistos são: 1) Respostas endoteliais e regulação gênica causadas pelo *shear stress*; 2) Efeitos da pressão hidrostática na morfologia da célula endotelial, expressão gênica da superfície celular endotelial e proliferação das células endoteliais, 3) Efeitos da tração no endotélio de veias safenas humanas.

**Descritores:** Endotélio. Veia safena. Óxido nítrico. Revascularização miocárdica.

1. Médico-residente.
2. Mestre em Ciências Médicas; Pós-graduanda.
3. Médico Cirurgião Vascular; Pós-graduando.
4. Fisioterapeuta; Pós-graduanda.
5. Médica Cirurgiã Cardiorrástica; Médico assistente.
6. Professor associado; Chefe da Disciplina de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.
7. Professor doutor; Chefe do Centro Cirúrgico do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.
8. Professor Titular; Suplente da Chefia do Departamento e Coordenador do Programa de Pós-graduação do Departamento de Cirurgia e Anatomia.

Trabalho realizado no Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Apoio da FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brasil, e da FAEPA - Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Endereço para correspondência: Paulo Roberto B. Évora. Rua Rui Barbosa, 367, Apt. 15 14015 120 - Ribeirão Preto - SP - Brazil.  
E-mail: prbevora@netsite.com.br

Artigo recebido em 11 de janeiro de 2007  
Artigo aprovado em 21 de fevereiro de 2007

### Abstract

Vascular endothelial cells are exposed to a variety of *in vivo* mechanical forces, specifically, shear stress for the blood flow, tensile stress from the compliance of the vessel wall and the hydrostatic pressure from containment of blood within inside the vasculature. Many authors studied hemodynamic, functional and morphological human saphenous veins alterations caused by these different forces with conflictant results. This review text was motivated with the specific aim of analyze literature data and some

experimental data carried out in our laboratory. The adopted review subjects were: 1) Endothelial responses and gene regulation to shear stress; 2) Effects of the hydrostatic pressure in the endothelial cell morphology, gene expression of the endothelial cellular surface and proliferation of endothelial cells; 3) Effects of the traction on the human saphenous vein endothelium.

**Descriptors:** Endothelium. Saphenous vein. Nitric oxide. Myocardial revascularization.

## INTRODUÇÃO

A eficácia da revascularização do miocárdio foi estabelecida por três grandes estudos: o *European Coronary Surgery Study Group*, o *Veteran's Administration Coronary Artery Bypass Surgery Cooperative Study Group* (VA) e o *Coronary Artery Surgery Study Group* (CASS). Estes três estudos estabeleceram a superioridade da revascularização direta do miocárdio para certos subgrupos de pacientes portadores de doença arterial coronariana. Com o seguimento em longo prazo dos pacientes selecionados nestes três estudos, ficou evidente que os benefícios do tratamento cirúrgico comparados com aos do tratamento clínico diminuíram com o tempo de evolução. O que se esperava da revascularização do miocárdio, como uma solução para a doença arterial coronariana, foi frustrada pela longevidade das pontes de safenas.

Sabe-se que a patência da veia safena é muito inferior à patência dos enxertos arteriais. Isto se deve, em parte, ao fato que a parede da veia safena normal tem diferentes características estruturais e funcionais que podem ser afetadas por altas pressões de distensão, tanto na fase de preparação da veia, quanto pela sua inserção no sistema arterial. Além disso, durante o processo de preparação, a sua manipulação acaba por expô-la a variados graus de distensão, que podem ser extremamente altos. Quando implantado na circulação arterial, um enxerto venoso troca um ambiente de fluxo baixo, não pulsátil e com baixa pressão por um ambiente de alto fluxo pulsátil com alta pressão e forças de cisalhamento (*shear stress*), sendo sujeitado a significativas alterações hemodinâmicas. Essas alterações hemodinâmicas podem ser, pelo menos em parte, responsáveis por alterações funcionais e morfológicas, precoces ou tardias da parede venosa, que culminam na hiperproliferação da camada íntima seguida de alterações ateromatosas, que contribuem para trombose precoce do enxerto.

A dependência de remodelamento na presença de endotélio intacto e flutuações morfológicas que refletem as forças de cisalhamento sugerem que o endotélio vascular é um sensor de forças mecânicas de fluido locais. A distribuição não-randômica de lesões ateroscleróticas observadas em doentes humanos e projetos experimentais favorece as forças hemodinâmicas locais como fatores cruciais no desenvolvimento dessa doença. Assim, as forças hemodinâmicas se apresentam como importantes estímulos ao endotélio vascular, perfazendo papel importante em processos fisiológicos e patológicos (aterosclerose, hipertensão, trombose).

Diversos autores estudaram as alterações hemodinâmicas, funcionais e morfológicas em veias safenas submetidas às condições de enxerto no sistema arterial, tanto *in vivo* e *in vitro*. Esses estudos estão inseridos em diversas linhas de pesquisa, muitas vezes, chegando a resultados discrepantes. A motivação desta revisão foi reunir os dados apresentados na literatura, bem como conclusões do nosso laboratório.

## FORÇAS MECÂNICAS QUE AFETAM A CAMADA ÍNTIMA VASCULAR

As células endoteliais vasculares estão expostas a uma variedade de forças mecânicas *in vivo*, resultantes do fluxo sanguíneo pulsátil. Dentre essas forças, destacam-se: forças de cisalhamento, tangenciais à parede do vaso, produzidas pelo atrito com o fluxo sanguíneo viscoso, tensão de complacência da parede vascular e a pressão hidrostática do conteúdo sanguíneo no interior da vasculatura.

Os efeitos da pressão hidrostática têm recebido atenção apenas recentemente, contudo, resultados de inúmeros estudos sugerem que as respostas das células endoteliais à pressão hidrostática diferem da tensão da parede ou das forças de cisalhamento.

Tais estudos demonstram que a exposição, tanto de células endoteliais bovinas e humanas, a pressões hidrostáticas mantidas estimula a proliferação celular e altera a morfologia celular, evidenciada pelo alongamento celular (sem uma orientação celular predominante), concomitantemente com a reorganização citoesquelética [1-4]. Ademais, exposição de células endoteliais humanas a pressões sustentadas não altera a expressão na superfície celular de moléculas de adesão (ICAM-1), molécula de adesão celular (VCAM-1) E-Selectina, CD31, e p96 [5]. Esses resultados estão em contraste com a supra-regulação de ICAM-1 e a infra-regulação de VCAM-1 e E-Selectina [6] induzidas em células endoteliais por forças de cisalhamento.

#### RESPOSTAS ENDOTELIAIS *IN VITRO* ÀS FORÇAS DE CISALHAMENTO

Evidências da ação direta das forças hemodinâmicas sobre a estrutura endotelial e sua função advêm de estudos *in vitro*, nos quais células humanas e animais do endotélio foram sujeitas a forças mecânicas definidas [7-9]. Resultados desses experimentos imitam a resposta *in vivo* do endotélio a diferentes forças de cisalhamento. Células endoteliais expostas ao cisalhamento unidirecional alongam e se alinham em direção ao fluxo laminar, mudanças que foram acompanhadas pela formação de fibras de stress e redistribuição das fibras de actina e microtúbulos. Sob efeito não laminar, essas mesmas células se tornaram poligonais, sem uma direção fundamental. O *stress* pelo fluxo laminar leva ao esgotamento do ciclo celular, enquanto baixos níveis de fluxo turbulento por intervalo mínimo de 3 horas, ou fluxo desordenado, ativam o ciclo celular, contudo, sem evidências de retração celular ou lesão [10-12].

A resposta às forças de cisalhamento se inicia instantaneamente após o início do fluxo, onde mudanças agudas na estrutura da membrana, organização do citoesqueleto e composição, além de fosforização de proteínas de adesão, foram observadas [13-15]. Esta resposta continua com modificações na atividade e distribuição dos canais iônicos através da membrana celular endotelial [13,16], alteração no cálcio intracelular [16-18], assim como na ativação e fosforilação de muitas moléculas sinalizadoras como as proteínas G, MAP kinase, Erk e outras [19,20]. Outras respostas imediatas, como a produção de metabólitos do ácido araquidônico e mediadores vasoativos, também são detectadas [7,21-23]. A maioria das respostas imediatas não requer síntese protéica e parece envolver a regulação ao nível das enzimas ou disponibilidade de substrato.

As respostas mais tardias (minutos a horas após o início do fluxo) incluem a *up* e *downregulation* das moléculas endoteliais, muitas das quais são componentes chaves de sistemas efetores fisiológicos ou mesmo patológicos, localizados no endotélio vascular que modulam a trombose

e hemostasia, tônus vascular, crescimento vascular e reações inflamatórias. O que se verificou é o fato de muitas das moléculas são reguladas ao nível da expressão gênica, provendo um útil paradigma para a investigação da regulação gênica pelas forças biomecânicas.

#### EFEITOS DA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA MORFOLOGIA DA CÉLULA ENDOTELIAL

A morfologia de uma célula é, além de indicador de função, um participante dinâmico em sua função. Alterações na morfologia celular estão associadas com a diferenciação celular, proliferação, migração e as interações célula-célula [24]. *In vivo*, células endoteliais vasculares estão alongadas e alinhadas com direção do fluxo sanguíneo. Contudo, em vasos sanguíneos, onde o fluxo sanguíneo está alterado, estas células são arredondadas e presentes em morfologia de revestimento de pedra [25]. No nível da capilaridade, as células endoteliais estão planas e células simples percorrem ao redor para formar a luz do vaso. No processo de angiogênese, células endoteliais passam por várias alterações morfológicas em ordem para formar um novo pequeno vaso sanguíneo; especificamente, células no sítio de um novo capilar alongado, então migram, invadindo a matriz extracelular, que originalmente circunda a parede do vaso [26]. Ademais, a iniciação da apoptose ou proliferação são reguladas por um grau de extensão celular e é independente da área total de adesão de placas por célula; contudo, um efeito sinérgico existe entre a área celular total e as proteínas de adesão das superfícies celulares, de modo que células com superfícies com fibronectina e colágeno tipo I são mais propensas a entrar em processo de apoptose que células em superfícies com vitronectina [27]. Deste modo, mesmo sendo um importante fenômeno em sua própria origem, as alterações morfológicas que ocorrem quando as células estão expostas a pressões podem contribuir ou mesmo controlar mudanças de função celular, como um acréscimo na proliferação celular e mudanças na expressão de proteínas celulares.

Exposição *in vitro* de células endoteliais bovinas e humanas a pressões estáticas de 1.5-109 cm por 1-9 dias resulta em alongação sem uma orientação celular predominante [1-4]. Tais mudanças na forma celular estão acompanhadas por reorganização concomitante do citoesqueleto. Especificamente, células endoteliais submetida à pressão perdem suas características periféricas da banda de actina e reorganizam regiões internas do citoesqueleto de uma matriz tipo “teia de aranha” para uma formação alinhada, com fibras paralelas [1-4]. Em adição, o citoesqueleto se reorganiza de um simples plano em células mantidas sob condições controladas para uma estrutura multilaminada após sua exposição à pressão; o número dessas camadas (até cinco distintos planos abaixo de 10cm),

assim como as fibras individuais em sua largura, dependem da magnitude e duração de tal pressão aplicada [3].

As mudanças na morfologia celular e do citoesqueleto, que ocorrem enquanto as células estão expostas à pressão hidrostática mantida, são similares às mudanças observadas na angiogênese e durante outro evento de proliferação celular. É interessante notar que o alongamento celular e o alinhamento do citoesqueleto são similares aos do início da angiogênese. Ademais, o alongamento celular (sem predomínio de orientação celular) observado durante a exposição de tais células à pressão hidrostática e similar às mudanças morfológicas observadas durante a exposição de tais células à turbulência do cisalhamento, força mecânica também associada com acréscimo da proliferação celular e a mudanças morfológicas que resultam de espalhamento celular que inibe a apoptose e inicia proliferação celular endotelial *in vitro* [27]. Deste modo, as mudanças morfológicas que ocorrem conseqüentes à exposição de células endoteliais à pressão sugerem que as mesmas exibem um tipo proliferativo ativo.

#### EFEITOS DA TRAÇÃO SOBRE O ENDOTÉLIO DA VEIA SAFENA

Em experimentos *in vitro*, os segmentos de VSH foram estirados longitudinalmente e se demonstrou que a manobra aumenta a expressão de metaloproteinases, enzimas que degradam a matriz extracelular, e dos receptores para estas enzimas, além de estimular a proliferação celular, especialmente na adventícia [28]. Os fatores de crescimento e as metaloproteinases atuam em conjunto, favorecendo a formação da neoíntima. As metaloproteinases degradam a substância extracelular na qual estão embebidas as células de músculo liso e as liberam do suporte que as mantêm em um estado de latência, com baixa velocidade de reprodução, facilitando, assim, sua migração e proliferação. Também se observou que a atividade aumentada das metaloproteinases coincide com a proliferação de células de músculo liso e com a formação de neoíntima em pontes de VS de carneiros colocadas na circulação carotídea [29].

A VS é submetida a uma certa manipulação durante sua extração e implante como ponte, como a sua distensão mediante a perfusão com solução fisiológica a alta pressão para localizar seus ramos colaterais, ligá-las e poder selecionar os segmentos que serão utilizados como pontes. Na VSH, distendida experimentalmente com a mesma pressão que se utiliza, previamente à seleção do segmento a ser implantado (350 mmHg, durante 2 minutos), descreveu-se o aumento da expressão do RNA mensageiro para genes que induzem a produção de fatores de crescimento celular [30]. A inibição da expressão destes genes em segmentos de VS de carneiro, antes de colocá-los como pontes na artéria carótida, diminui a formação da neoíntima nos primeiros meses do implante [31].

Recente investigação utilizando segmentos de VSH não distendida e extraída através de múltiplas pequenas incisões escalonadas evidenciou falta de resposta à acetilcolina. Concluiu-se que a possível causa de disfunção endotelial poderia ser causada por lesão de tração [32].

#### REGULAÇÃO GÊNICA ENDOTELIAL PELO ESTRESSE CAUSADO POR FORÇAS DE CISALHAMENTO

O remodelamento de vasos sanguíneos acompanha processos fisiológicos e patológicos, tais como a angiogênese, vasculogênese, aterosclerose, hipertensão e reestenose. O remodelamento vascular ocorre em resposta tanto a um estímulo bioquímico como biomecânico, e tem sido demonstrado ser independente da presença de uma camada endotelial intacta. Em virtude de sua posição anatômica, células endoteliais estão constantemente expostas a forças hemodinâmicas geradas pelo fluxo sanguíneo, forças que consistem do *stress* do fluido e pressão. Tais forças afetam a estrutura das células endoteliais e função, mudanças que comumente são mediadas pela estimulação ou inibição dos genes endoteliais.

Atualmente, alguns genes têm sido descobertos como reguladores de tais forças hemodinâmicas, esses elementos de resposta às forças de cisalhamento (SSREs) se ligam a fatores de transcrição, dentre eles, os fatores nucleares NFKappaB e NFATc2; e os fatores de transcrição Sp1, Fos e Jun, que são ativados por forças hemodinâmicas.

#### EFEITOS DA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA EXPRESSÃO GÊNICA DA SUPERFÍCIE CELULAR ENDOTELIAL

Em adição às modificações morfológicas e citoesqueléticas, a exposição das células endoteliais à pressão sustentada pode alterar a expressão basal ou estimular a mesma de antígenos de superfície como  $\alpha 51$  e E-selectina (CD62E), uma molécula de adesão induzida por citocina e pensada em participar de papel importante mobilização de neutrófilos e na angiogênese. Integrina 51 tem papel nas interações célula-matriz célula-célula, assim como na transdução de estímulos mecânicos nas células endoteliais. A exposição de células endoteliais aórticas bovinas a pressão de 52 cm, por períodos de tempo de 12-48 horas, resulta em maior enclustamento da vinculina, talina e integrina 5 em placas focais de adesão, no estreitamento da laminina e colágeno tipo IV na matriz extracelular, e no acréscimo da deposição de fibronectina e laminina (mas não vitronectina) na matriz extracelular [33]. Exposição de células endoteliais da veia umbilical (HUVEC) a 4 cm de pressão mantida por um dia não altera a expressão na superfície celular da ICAM-1 ou CD54, VCAM-1 ou CD106, E-Selectina e CD31 e p96 [5].

Contudo, a exposição de HUVEC a pressão parece tanto prolongar como aumentar a expressão de E-Selectina que ocorre após exposição dessas células a 100ng/ml de lipossacarídeo E. coli [4].

#### EFEITOS DA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA PROLIFERAÇÃO DA CÉLULA ENDOTELIAL

A maioria das células endoteliais *in vivo* exibe uma taxa de renovação baixa (<1/ano). A proliferação celular endotelial, contudo, é observada sob um número de condições fisiológicas normais, como na cicatrização de um ferimento, embriogênese e ovulação. Em adição, um número de estados patológicos, incluído o glaucoma induzido por microangiopatia, artrite reumatóide e crescimento de tumores sólidos estão associados a acréscimo da proliferação celular. Interessantemente, tais doenças também estão associadas ao acréscimo, ou melhor, elevação da pressão hidrostática local.

A associação *in vivo* entre as pressões hidrostáticas e o aumento da proliferação celular pode ser somente circunstancial, embora uma relação causal não possa ser excluída. Uma possível ligação é sugerida por estudos *in vitro* de muitos laboratórios que demonstraram que a exposição de células bovinas, suína e humana de células endoteliais a pressões hidrostáticas mantida num intervalo de 1.5 - 260 cm ou períodos de tempo de 1-9 dias estimulam a proliferação celular e perda da inibição pelo contato celular, formando multicamadas celulares.

#### EFEITOS DA PRESSÃO DE DISTENSÃO *IN VITRO*

A veia safena magna continua sendo enxerto mais usado, juntamente com a artéria torácica interna pediculada, na revascularização cirúrgica do miocárdio, mesmo diante das vantagens dos enxertos arteriais, que por serem adaptados a território de pressão apresentam melhores resultados em longo prazo. Essa adaptação depende, necessariamente, da função parácrina do endotélio que, pela produção de substâncias vasodilatadoras e antiplaquetárias, previne o espasmo, trombose, proliferação e, mesmo, proteção contra os mecanismos de aterosclerose.

Muito se tem estudado em função dessa inferioridade funcional da veia safena, atribuindo-se grande importância às possíveis lesões traumáticas e/ou funcionais, já na sua extração e preparo para a revascularização cirúrgica do miocárdio. Uma vez colhida, a veia é canulada, suavemente pressurizada para identificar e ligar colaterais previamente não identificadas. As taxas de patência podem estar relacionadas com lesões da veia durante a sua retirada e preparação [34-36]. Embora existam comprovadas vantagens funcionais das técnicas que manipulam o mínimo possível os enxertos venosos (técnicas “*non-touch*”), a canulação e

a pressurização das veias, pela sua praticidade, ainda é uma prática quase que universal.

Nas décadas de 60 e 70, foram estabelecidas, claramente, lesões morfológicas não só do endotélio, mas também das outras camadas que formam a parede da veia. Por esses estudos, a pressurização das veias seria até uma prática proibitiva, o que não se observou na evolução da cirurgia da revascularização do miocárdio. Assim, surgiu um grande desafio de investigação que seria descobrir até quando as lesões morfológicas causadas pela pressurização estariam associadas a lesão funcional. Em outras palavras, existiria um “barotrauma” funcional em veias safena pressurizadas?

Na década de 90, trabalhando na Mayo Clinic (Rochester, MN, USA), constatamos que a infusão que infusões *in vivo* de solução cardioplégica cristalóide (acima de 600 mmHg) não induziu disfunção endotelial (estudo *in vitro* utilizando “*organ chambers*”) pelo comprometimento da liberação de NO em coronárias caninas normais [37].

Um outro estudo, motivador de investigações laboratoriais na Divisão de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -USP, foi ressaltado na introdução desse trabalho como, talvez, o mais bem delineado até o momento, com a finalidade de investigar a relação da magnitude da pressão de distensão e o grau de lesão, estrutural, bioquímica e funcional da parede vascular da veia safena. Neste estudo, os segmentos de veias safenas humanas de 20 pacientes foram distendidos com pressões de 100 a 300 mmHg, sendo sua reatividade vascular estudada em banhos orgânicos. Além dos estudos funcionais, as lesões estruturais foram avaliadas por microscopia de varredura e pela localização imunohistoquímica da NOS endotelial.

Segmentos de veia safena distendidos com pressão de 100 mmHg mantiveram a sua capacidade de resposta ao cloreto de potássio (90 mmol/l) e à fenilefrina ( $10^{-6}$  mol/l), mas aqueles pressurizados com 300 mmHg perderam a sua reatividade a estes agentes. Veias distendidas com 300 mmHg também tiveram comprometimento dos relaxamentos dependentes do endotélio causados pela acetilcolina ( $10^{-10}$  -  $10^{-6}$  mol/l) e bradicinina ( $10^{-10}$  -  $10^{-6}$  mol/l). Estudos quantitativos das lesões estruturais endoteliais foram aparentes quando se utilizou a pressão de 300 mmHg, mas células endoteliais remanescentes mantiveram forte coloração imunohistoquímica positiva para a NOS endotelial. Ao contrário das veias submetidas a pressões de 100 mmHg, as veias pressurizadas a 300 mmHg mostraram grandes áreas de endotélio desnudo. Este estudo concluiu que a distensão das veias safenas a pressões equivalentes a pressões arteriais elevadas resulta em alterações estruturais e bioquímicas do endotélio “que não são acompanhadas de alterações funcionais imediatas”. Em outras palavras, o endotélio apresenta uma grande reserva funcional.

Durante o decorrer das investigações em andamento no

nosso laboratório, foram sendo colhidas informações na literatura sobre os efeitos de forças mecânicas sobre a função endotelial. Essas informações nos pareceram bastante especializadas, mas interessantes para o aprofundamento de conhecimentos sobre a revascularização do miocárdio, que é, sem dúvida, a cirurgia cardíaca mais freqüente. O leito arterial que consiste de vasos musculares e elásticos de grande luz, assim como arteríola e vasos pré-capilares, estão constantemente expostos a forças hemodinâmicas que variam enormemente em magnitude, freqüência e direção. Tais forças consistem de pressão agindo perpendicularmente e tangencialmente (cisalhamento) na parede vascular.

Quando a veia safena é interposta na circulação arterial, ela passa a sofrer a ação desses fenômenos físicos. Acresça-se a esses tipos de forças os possíveis efeitos da tração na funcionalidade da veia safena. O delineamento de nossas investigações centrou-se apenas na pressão hidrostática gerada pela infusão de solução fisiológica de Krebs, na fase de sua extração e preparo. Os segmentos estudados foram todos correspondentes ao início da veia safena junto ao maléolo interno da perna direita. Essas veias foram pouco manipuladas, não apresentavam varicosidades ou reações inflamatórias macroscópicas. Não foram, também, inicialmente pressurizadas e nem expostas a nenhuma droga vasodilatadora.

Achamos que um número de 20 veias, de diferentes pacientes, seria, embora sujeito a críticas, um número razoável para “diluir” a extrema variabilidade dos vasos de paciente para paciente. Permanecia um possível viés que seria a utilização sempre do início da veia com a possibilidade da existência de diferenças da função endotelial, conforme a região da retirada da veia. Esse viés foi aliviado por recente publicação do *Texas Heart Institute* que, utilizando ensaios *in vitro* com veias safenas sob ação vasodilatadora da acetilcolina (dependente do endotélio) e do nitroprussiato de sódio (independente do endotélio) não revelou diferenças funcionais entre segmentos de veia safena da coxa e do início da perna [38].

Os principais achados experimentais por nós obtidos até o momento foram: 1) A partir da pressurização com 200 mmHg já se observa uma tendência à diminuição da expressão do CD34, tornando-se estatisticamente significativa para a pressurização com 300 mmHg (Figura 1); 2) A microscopia de alta resolução não revelou diferenças em relação ao percentual de superfície intimal recoberta por endotélio; em relação ao diâmetro das veias safenas (camadas íntima e média), ao perímetro e ao diâmetro interno das veias safenas; 3) Ocorreu um aumento não significativo da expressão da eNOS no endotélio na pressurização com 100 mmHg, seguida de uma tendência à diminuição a partir de 200 mmHg, diferença essa que se tornou significativa em níveis de 300 mmHg; 4) A expressão da eNOS na musculatura lisa foi equivalente à expressão endotelial e não sofreu o efeito da

pressurização (Figura 2); 5) Não houve expressão significativa da nNOS, tanto no endotélio como na musculatura lisa; 6) Não houve expressão significativa da iNOS no endotélio da veia, ao contrário da musculatura lisa, que revelou a expressão dessa enzima não afetada pelas pressurizações experimentais (Figura 3); 7) A expressão da nitrorosina não foi relevante, aparecendo fracamente no endotélio venoso de 7 pacientes, sendo completamente ausente nos outros 13 pacientes; 8) Ausência de aumento dos níveis teciduais de nitrato/nitrito determinados por quimioluminescência; 9) Diminuição do MDA nas veias submetidas a pressões de 300 mmHg; e 10) Não houve comprometimento da contratilidade e dos relaxamentos estudados *in vitro* com auxílio de “organ chambers”.

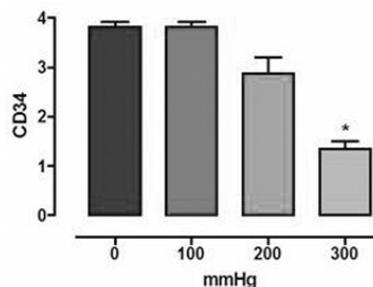


Fig. 1 - Expressão imunohistoquímica do CD 34 (n=20, ANOVA,  $p < 0,05$ ). O asterisco indica diferença estatisticamente significativa

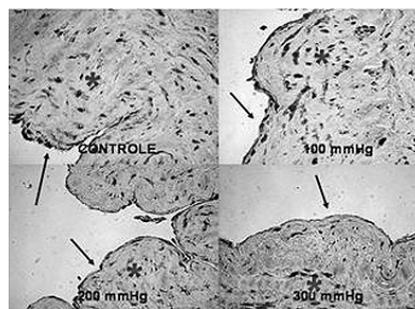


Fig. 2 - Imunohistoquímica para a eNOS. As setas indicam a expressão da eNOS no endotélio da veia safena e os asteriscos indicam regiões de expressão da eNOS na musculatura lisa vascular (400 X)

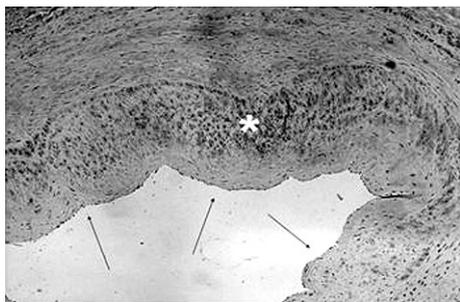


Fig. 3 - Imunohistoquímica da iNOS. As setas indicam a quase nula expressão da iNOS no endotélio da veia safena e o asterisco indica uma exuberante expressão da iNOS na musculatura lisa vascular (100 X)

Nessa linha de pesquisa, um excelente trabalho experimental foi publicado pelo grupo do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas - FMUSP. Nesse trabalho, quarenta (40) segmentos de VSH foram cultivados “*ex-vivo*”, sob condição hemodinâmica venosa (CHV) (sem pressão, fluxo:5 ml/min) e sob condição hemodinâmica arterial (CHA) (pressão: 80mmHg, fluxo:50mL/min). Foram analisadas: viabilidade celular (coloração MTT), densidade celular (coloração Hoechst 33258) e apoptose (ensaio TUNEL), antes e um, dois e quatro dias após o procedimento. Determinaram-se alvos moleculares alterados precocemente nas veias cultivadas sob condição arterial, através da análise “*cDNA microarray*” de segmentos das VS. A busca desses alvos foi realizada por meio de *pool* homogeneizado do RNA desses segmentos venosos, interagindo por homologia em lâmina contendo 16000 genes humanos predeterminados (*Agilent Technologies slide*). Os genes com expressão alterada foram certificados por PCR em tempo real, em veias de 16 diferentes indivíduos. Observou-se diminuição gradual da densidade celular e da viabilidade tecidual nas VS cultivadas mediante CHA, enquanto nenhuma alteração ocorreu quando a veia foi cultivada até quatro dias na CHV. No grupo sob CHA, houve sinais de processo apoptótico celular (TUNEL-positivo) já a partir do 1º dia de cultivo, o que não ocorreu no outro grupo. A densidade celular das veias sob regime arterial, decorridas 24h de cultivo, era similar à das amostras frescas das mesmas, mas inúmeras células já apresentavam indícios de processo apoptótico.

Os alvos moleculares mais alterados (de acordo com o PCR em tempo real) e selecionados para pesquisa foram o Oncogene 3 e a Interleucina 1 $\beta$ . A expressão do Oncogene 3 estava elevada em 11 (68,7%) das veias cultivadas sob regime arterial, enquanto observou-se aumento da expressão da Interleucina 1 $\beta$  em nove (56,2%) desses segmentos venosos

( $p < 0,05$ ). Esse modelo de estudo “*ex vivo*” permitiu mimetizar os eventos iniciais sofridos “*in vivo*” pela VS utilizada na RM. No grupo CHA, houve perda de viabilidade precoce das células (apoptose) e elevação significativa nas expressões gênicas do Oncogene 3 e da Interleucina 1 $\beta$ . O seguimento em longo prazo desses pacientes poderá esclarecer o real papel dessas alterações precoces na perviabilidade desses enxertos venosos [39].

Comparando-se veias safenas humanas obtidas por técnicas convencionais e técnicas atraumáticas (“*non-touch*”), a literatura tem mostrado redução da expressão da eNOS e da liberação de NO em veias que são mais instrumentadas durante a sua extração/dissecção [40,41]. Os achados imunohistoquímicos de nossa investigação confirmam o comprometimento da expressão da eNOS pela maior manipulação da veia safena. Seria interessante uma comparação entre veias safenas minimamente manipuladas com veias retiradas pela técnica convencional, controlando-se as pressurizações em níveis não superiores a 100 - 150 mmHg.

Apenas com os dados obtidos pela imunohistoquímica, foi possível concluir que a distensão excessiva da veia safena resulta em comprometimento da função endotelial. O conjunto de nossas observações experimentais revelou que pressurizações até 300 mmHg não afetam a veia safena do ponto de vista farmacológico e de reatividade vascular *in vitro*, causam disfunção endotelial (CD34), não geram radicais livres pela peroxidação lipídica (MDA normal e não expressão da nitrotirosina), não afetam os níveis teciduais de nitrito/nitrato e podem funcionar como estímulo inflamatório (expressões da iNOS) na musculatura lisa. Isso permite especular que, embora em curto prazo, não ocorra um comprometimento das veias safenas retiradas e pressurizadas com grande cuidado, a manipulação cirúrgica cria, de algum modo, uma espécie de “cicatriz molecular”, que pode afetar em tempos variados a patência de enxertos venosos coronarianos.

As nossas investigações confirmam as impressões, objetivas ou subjetivas, de que os fatores que levam à oclusão de pontes de safena coronarianas acabam por protagonizar um “*árido duelo endotelial dinamitando nossas pontes*”. Permanece, assim, o princípio de que a transposição de um segmento vascular venoso para o território arterial de grande resistência com especialização funcional de sua parede, é uma situação de “*morte anunciada*” em tempos variados e imprevisíveis.

Finalizando essa revisão, não poderia deixar de ser mencionado um livro fundamental que trata, especificamente, da ação de forças mecânicas sobre o endotélio. Trata-se de uma obra editada por Lelkes, em 1999, que tem sido uma espécie de “*bíblia*” para as investigações em andamento no nosso laboratório, sendo o texto básico utilizado na presente revisão [42].

## REFERÊNCIAS

1. Acevedo AD, Bowser SS, Gerritsen ME, Bizios R. Morphological and proliferative responses of endothelial cells to hydrostatic pressure: role of fibroblast growth factor. *J Cell Physiol.* 1993;157(3):603-14.
2. Sumpio BE, Banas AJ, Levin LG, Johnson G Jr. Mechanical stress stimulates aortic endothelial cells to proliferate. *J Vasc Surg.* 1987;6(3):252-6.
3. Salwen S. MS Thesis. New York:Department of Biomedical Engineering, Rensselaer Polytechnic Institute;1994.
4. Schwartz E. Mechanotransduction of sustained hydrostatic pressure by human endothelial cells [PhD Thesis]. New York:Department of Biomedical Engineering, Rensselaer Institute;1999.
5. Schwartz E, Bizios R, Gerritsen M. Effects of sustained hydrostatic pressure on expression of endothelial cell-leukocyte adhesion molecules. In: Reeves J, ed. *Pulmonary edema*. New York:Futura Publishing Company;1998. p.195-203.
6. Sampath R, Kukielka GL, Smith CW, Eskin SG, McIntire LV. Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Ann Biomed Eng.* 1995;23(3):247-56.
7. Frangos JA. *Physical forces and the mammalian cell*. San-Diego:Academic Press;1993.
8. Resnick N, Gimbrone MA Jr. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J.* 1995;9(10):874-82.
9. Panaro NJ, McIntire LV. Flow and shear stress effects on endothelial cell function. In: Sumpio BE, ed. *Hemodynamic forces and vascular cell biology*. Austin:R.G. Landes Company;1993. p.5.
10. Dewey CF Jr, Bussolari SR, Gimbrone MA Jr, Davies PF. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng.* 1988;103(3):177-85.
11. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev.* 1995;75(3):519-60.
12. Nerem RM, Harrison DG, Taylor WR, Alexander RW. Hemodynamics and vascular endothelial biology. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;21(Suppl 1):S6-10.
13. Davies PF. Overview: temporal and spatial relationships in shear stress-mediated endothelial signalling. *J Vasc Res.* 1997;34(3):208-11.
14. Davies PF. Mechanisms involved in endothelial responses to hemodynamic forces. *Atherosclerosis.* 1997;131(suppl):S15-7.
15. Isales C, Rosales O, Sumpio BE. Mediators and mechanisms of cyclic strain and shear stress-induced vascular responses. In: Sumpio BE, ed. *Hemodynamic forces and vascular cell biology*. 1993.
16. Olesen RG, Clapham DE, Davies PF. Hemodynamic shear stress activates a K<sup>+</sup> current in vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;331(6152):168-70.
17. Dull RO, Davies PF. Flow modulation of agonist (ATP) response (Ca<sup>2+</sup>) coupling in vascular endothelial cells. *Am J Physiol.* 1991;261(1 pt 2):H149-54.
18. Shen J, Luscinikas FW, Connolly A, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr. Fluid shear stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells. *Am J Physiol.* 1992;262(2 Pt 1):C384-90.
19. Takahashi M, Ishida T, Traub O, Corson MA, Berk BC. Mechanotransduction in endothelial cells: temporal signaling events in response to shear stress. *J Vasc Res.* 1997;34(3):212-9.
20. Ishida T, Takahashi M, Corson MA, Berk BC. Fluid shear stress mediated signal transduction: how do endothelial cells transduce mechanical force into biological responses? *Ann NY Acad Sci.* 1997, 811:12-24.
21. Furchgott RF. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci Rep.* 1999;19(4):235-51.
22. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 1986;250(6 Pt 2):H1145-9.
23. Yoshizumi M, Kurihara H, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, et al. Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;161(2):859-64.
24. Sims JR, Karp S, Ingber DE. Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal, and nuclear shape. *J Cell Sci* 1992;103(Pt 4):1215-12.
25. Thubrikar MJ, Robicsek F. Pressure-induced arterial wall stress and atherosclerosis. *Ann Thorac Surg.* 1995;59(6):1594-603.
26. Stromblad S, Cheresh DA. Cell adhesion and angiogenesis. *Trends Cell Biol.* 1996;6(12):462-8.
27. Chen CS, Marksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric control of cell life and death. *Science.* 1997;276(5317):1425-8.
28. Meng X, Mavromatis K, Galis ZS. Mechanical stretching of human saphenous vein grafts induces expression and activation of matrix-degrading enzymes associated with vascular tissue injury and repair. *Exp Mol Pathol.* 1999;66(3):227-37.

29. Southgate KM, Mehta D, Izzat MB, Newby AC, Angelini GD. Increased secretion of basement-membrane degrading metalloproteinases in pig saphenous vein into carotid artery interposition grafts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(7):1640-9.
30. Galea J, Armstrong J, Francis SE, Cooper G, Crossman DC, Holt CM. Alterations in c-fos expression, cell proliferation and apoptosis in pressure distended human saphenous vein. *Cardiovasc Res.* 1999;44(2):436-48.
31. Mannion JD, Ormont ML, Magno MG, O'Brien JE, Shi Y, Zalewski A. Sustained reduction of neointima with c-myc antisense oligonucleotides in saphenous vein grafts. *Ann Thorac Surg.* 1998;66(6):1948-52.
32. Cook RC, Crowley CM, Hayden R, Gao M, Fedoruk L, Lichtenstein SV, et al. Traction injury during minimally invasive harvesting of the saphenous vein is associated with impaired endothelial function. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127(1):65-71.
33. Thoumine O, Nerem RM, Girard PR. Oscillatory shear stress and hydrostatic pressure modulate cell-matrix attachment proteins in cultured endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1995;31(1):45-54.
34. Soyombo AA, Angelini GD, Bryan AJ, Newby AC. Surgical preparation induces injury and promotes smooth muscle cell proliferation in a culture of human saphenous vein. *Cardiovasc Res.* 1993;27(11):1961-7.
35. Bonchek LI. Prevention of endothelial damage during preparation of saphenous vein for bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1980;79(6):911-5.
36. Angelini GD, Breckenridge IM, Williams HM, Newby AC. A surgical preparative technique for coronary bypass grafts of human saphenous vein which preserves medial and endothelial functional integrity. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987;94(3):393-8.
37. Evora PR, Pearson PJ, Schaff HV. Impaired endothelium-dependent relaxation after coronary reperfusion injury: evidence for G-protein dysfunction. *Ann Thorac Surg.* 1994;57(6):1550-56.
38. Golbasi I, Tasatargil A, Aksoy NH, Sadan G, Karasu E, Turkey C, et al. A functional and histopathological comparison of proximal and distal saphenous vein contractility and morphology. *Tex Heart Inst J.* 2005; 32(3):287-93.
39. Dallan LAO, Miyakawa AA, Lisboa LA, Abreu Filho CA, Campos L, Borin T, et al. precocious structural and molecular (cDNA) changes in the human saphenous veins cultivated under arterial hemodynamic conditions. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2004;19(2):126-35.
40. Tsui JC, Souza DS, Filbey D, Karlsson MG, Dashwood MR. Localization of nitric oxide synthase in saphenous vein grafts harvested with a novel "no-touch" technique: potential role of nitric oxide contribution to improved early graft patency rates. *J Vasc Surg.* 2002;35(2):356-62.
41. Souza DSR, Dashwood MR, Tonazi A, Johansson B, Buffolo E, Lima R, et al. preparation of the saphenous vein for coronary artery bypass grafting: a new technique "no touch" that maintains the vein wall integral and provides high immediate patency. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2003;18(4):303-11.
42. Lelkes P, Gimbrone MA Jr. Mechanical forces and the endothelium. Amsterdam:Harwood Academic Publishers;1999.