

Geraldo Verginelli
Liberato J. A. Didio
Luis Boro Puig
D. J. Allen
G. H. Highinson
E. J. Zerbini

PESQUISA SOBRE A COMPOSIÇÃO ESTRUTURAL E QUÍMICA DA DURA-MATER DE VÁLVULAS CARDÍACAS LESADAS, PELA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE REFLEXÃO OU VARREDURA, PELA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E PELA MICROANÁLISE DE RAIOS X

Dez válvulas aórticas de dura-mater lesadas e recuperadas cirurgicamente 44 a 54 meses após implantação foram estudadas através da microscopia eletrônica de transmissão (TEM), de reflexão (SEM) e através da microanálise de raios X.

Dura-mater não utilizada na feitura de válvulas e válvulas aórticas de dura-mater não implantadas serviram de controle.

O estudo do tecido mostrou a presença de: macrófagos que penetram profundamente na espessura valvular com fagocitose de colágeno; presença de numerosas células bem conservadas com caracteres morfológicos de fibroblastos; sinais de adaptação do supercrescimento observado ao longo da borda livre (de corte) em várias válvulas; presença de matriz colágena estruturalmente normal circundada por áreas de fibrilas colágenas em degeneração.

Ficou demonstrado que válvulas de dura-mater homólogas apresentam modificações estruturais subcelulares com áreas de degeneração e proliferação que poderiam corresponder ao mecanismo normal de restauração ou uma seqüência degenerativa restauradora (remodelagem) que se inicia no momento da implantação. Concluem pela necessidade do estudo eletromicroscópico na avaliação da condição dos tecidos biológicos para se estabelecer a conveniência da sua utilização em cirurgia cardíaca.

A utilização dos tecidos biológicos como substitutos das valvas cardíacas tem proporcionado inúmeras vantagens, no que se refere à evolução dos pacientes operados¹⁻⁷.

A reduzida freqüência da tromboembolia na ausência do uso de anticoagulantes é fato comprovado.

No entanto, a longo prazo têm sido observadas alterações do tecido, com conseqüente comprometimento da dinâmica cardíaca.

Com a finalidade de conhecer melhor essas alterações, procuramos estudar as possíveis modificações subcelulares e as alterações químicas da dura-mater de válvulas que foram retiradas da posição aórtica após diferentes períodos de permanência e funcionamento em pacientes. A revisão bibliográfica mostra apenas estudos eletromicroscópicos de reflexão (varredura) em heterenxertos de porcos⁸⁻⁹, humanos¹⁰ ou fascia lata¹¹ e estudos de microscopia óptica da dura-mater.

MATERIAL E MÉTODOS

A dura-mater, obtida de cadáveres dentro de 14 horas após a morte, foi conservada e esterilizada em glicerina a 98%, em temperatura ambiente e durante um período mínimo de 12 dias, antes da feitura da válvula.

As técnicas de confecção e implantação foram descritas em trabalho precedente¹².

Dez válvulas aórticas de dura-mater lesadas e recuperadas cirurgicamente, 44 a 54 meses após implantação, foram colocadas em fixador de Karnovsky¹³, glutaraldeído a 3% tamponado com cacodilato, ou em formalina neutra a 10%, após terem sido irrigadas em solução de cloreto de sódio com heparina a 0,8%.

Dura-mater não utilizada na feitura de válvulas e válvulas de dura-mater não implantadas serviram de controle. Amostras representativas dissecadas dos locais de sutura nos suportes rígidos, da linha média e ao longo da borda livre das cúspides recuperadas e controles, foram preparadas para microscopia eletrônica e fo-

Trabalho realizado no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no Departamento de Anatomia do Medical College of Ohio, Toledo, Ohio, USA. (Prêmio Alvarenga 1980, da Academia Nacional de Medicina).

tomoscopia pelas técnicas convencionais ou outras, quando indicado.

Outras amostras foram tratadas com tetróxido de ósmio, desidratadas através de concentrações crescentes de etanol, secadas, com ponto crítico com CO líquido e cobertas com ouro para análise de imagem secundária ou com carbono para microanálise de raios X.

Os espécimes foram examinados em microscópio eletrônico de reflexão Cambridge S-180, com 15-25 KV, equipado com uma unidade de microanálise de raios X de energia dispersiva EDAX. Os espectros foram gerados em período de tempo de 149 s a 20 KV com ângulo de inclinação do espécime de 45 graus.

Análise de conjunto dos espectros foi obtida com um "EDAX programmed NOVA 2 Lab Computer" que tomou em consideração fatores de correção do número atômico, obliquidade do espécime e ângulos de alçada de aproximadamente 45 graus. O mapeamento de raios X, feito em período de 5 min, utilizou "scans" de repetição com o centróide ao nível de 2690 EV para cálcio e 2310 EV para enxofre. A largura de janela foi ajustada para uma metade de altura de ápice máximo.

RESULTADOS

A microscopia eletrônica de reflexão (SEM) de pequeno aumento das faces aórticas e ventriculares das válvulas de controle revelou uma superfície relativamente plana coberta com o que pareciam ser fibras de tecido conectivo e/ou vasos sanguíneos. Ambas as superfícies, com maior aumento, demonstraram primariamente uma rede de fibras de tecido conectivo de vários tamanhos (fig. 1). Foram raramente encontrados pequenos vasos sanguíneos de curto percurso ao longo dessas superfícies, os quais são tributários dos vasos meníngeos originais (calibre de arteríolas) que irrigavam a dura-mater. Os cortes finos feitos mostraram ser o tecido quase acelular e composto principalmente de fibras colágenas entrelaçadas (fig. 2).

Oito das 10 válvulas aórticas de dura-mater recuperadas apresentaram-se flexíveis e sem degeneração evidente. As superfícies dessas válvulas eram mais irregulares do que aquelas de controle. Os contornos da superfície apresentavam deposição de fibrila de variada espessura que, ocasionalmente, continha células sanguíneas (fig. 3). Células fusiformes (fig. 4) foram também notadas dentro da camada de fibrina, freqüentemente encontrada recobrindo as válvulas recuperadas. Essas células apresentavam um núcleo grande e irregular muitos vacúolos, numerosas inclusões e poucos orgânulos. Dentro dessa rede fibrinosa foram notadas áreas positivas à orceína (setas) de vários tamanhos e formas. Não foi demonstrado tecido elástico no controle, quer com técnicas de "coloração" fotomicroscópicas, quer eletromicroscópicas.

Em geral, foi difícil estudar o supercrescimento das superfícies das válvulas recuperadas devido à fibrina. A adaptação do supercrescimento (migração celular) (fig. 5) foi mais pronunciada ao longo do que havia sido a borda livre (acima de linha) do que na porção média (abaixo da linha) das válvulas. Em algu-

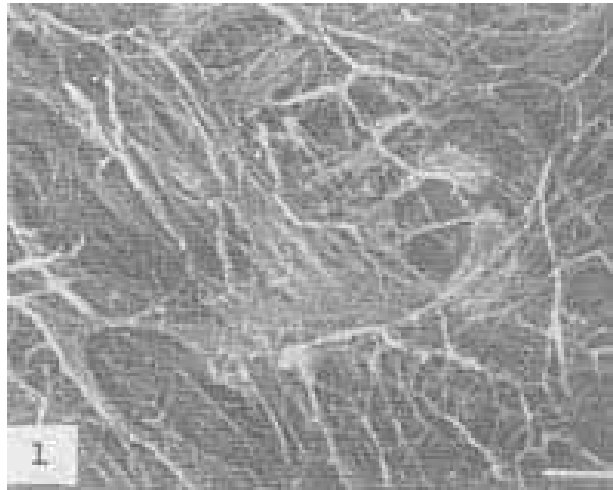


Fig. 1 - Pormenor em aumento de uma região da superfície, mostrando fibras características do tecido conectivo. Linha = 10 μ m.

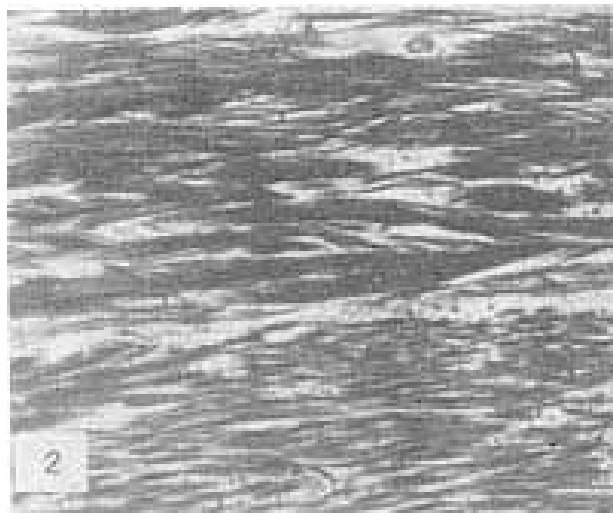


Fig. 2 - TEM de área semelhante à da figura 1, mostrando feixes entrelaçados de colágeno. Notar a periodicidade e a acelularidade. Linha = 1 μ m.

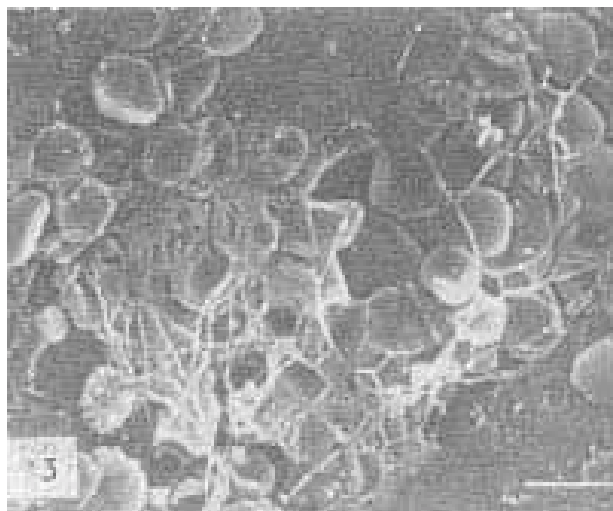


Fig. 3 - SEM de células sanguíneas retidas em rede de fibrina sobre a superfície da válvula recuperada. Linha = 10 μ m.

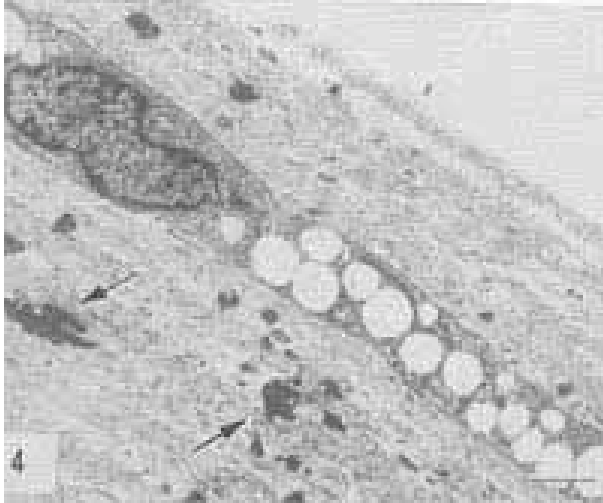


Fig. 4 - TEM de células repleta de vacúolos no interior de uma camada superficial de fibrina. As setas indicam áreas positivas à orceína. Linha = 2 μ m.

mas áreas, a fibrina cobria a maior parte dos pormenores morfológicos da superfície, expondo somente células sangüíneas, zonas isoladas de fibras de delicado tecido conectivo, vasos sangüíneos e/ou grossos feixes de fibras de tecido conectivo (fig. 6). As superfícies das válvulas de controle, nessas mesmas áreas, revelaram células meníngeas intactas dispersas entre delicadas fibras de tecido conectivo superficial. Feixes de fibras colágenas subjacentes podiam ser identificados, com grande aumento, em áreas onde o revestimento de células meníngeas era descontínuo. Em cortes finos das válvulas recuperadas foram encontrados fibrócitos e macrófagos sobre a superfície, bem como dispersos entre fibras colágenas, em contraste direto com a acelularidade das válvulas de controle. Os fibrócitos têm núcleos destoados, com distribuição uniforme de cromatina. Material filamentososo fino foi notado dentro das células. Macrófagos (fig. 7) foram freqüentes e tinham núcleo multilobulado, corpos de inclusão e numerosos microapêndices. Restos de corpos lipídicos foram observados infreqüentemente no controle. Essas inclusões (fig. 8), contudo, eram mais freqüentes na espessura da dura-mater recuperada em áreas de modelagem e calcificação do que em sua superfície.

Em duas das válvulas aórticas estudadas, a dura-mater estava descolada de seu anel de suporte. Nódulos amarelo-alaranjados foram notados ao longo da área de rotura bem como sobre a superfície ventricular.

A microanálise de raios X da superfície nodular do local da rotura (fig. 9) revelou: cobre, ósmio (como era de se esperar, devido ao tratamento com tetróxido de ósmio), enxofre, cálcio e ferro. O ferro e o cobre eram contaminantes da coluna. Os mapeamentos de raios X para cálcio e enxofre exibiram focos distintos ao longo do local de rotura. Como os espécimes foram tratados com tetróxido de ósmio (para permitir a correlação SEM/TEM), não foi possível mapear o fósforo. A linha K do fósforo e a linha M de ósmio estão localizadas na mesma área de energia (fig. 10). Foi possível, no entanto, retirar o ósmio do espectro de raios X para demonstrar o ápice de fósforo. A aná-

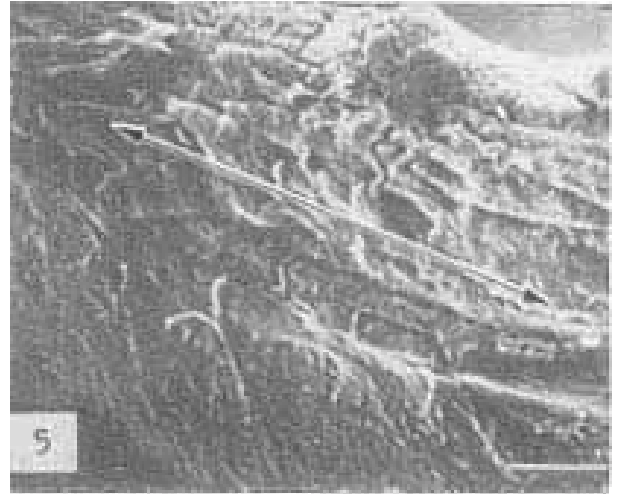


Fig. 5 - Superfície de porção da válvula recuperada, incluindo sua área de retração (acima da seta). Notar adaptação do supercrescimento. Linha = 260 μ m.



Fig. 6 - SEM de válvula recuperada com áreas desnudas de fibras colágenas (setas) e com células sangüíneas sobre fibrina superficial. Linha = 12 μ m.

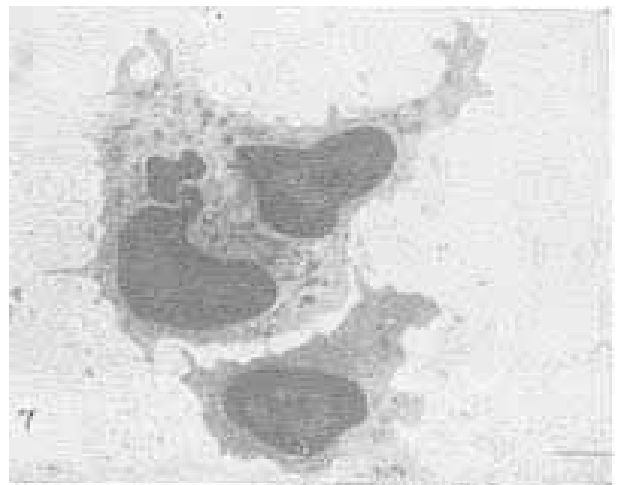


Fig. 7 - TEM de célula típica encontrada na espessura de válvulas recuperadas, demonstrando caracteres comuns aos macrófagos. Linha = 1 μ m.



Fig. 8 - TEM de válvula recuperada mostrando corpos lipídicos de vários tamanhos, circundados por matriz colágena. Linha = 2 µm.

lise de conjunto de espectro sem ósmio (fig. 11) computou a proporção entre cálcio, fósforo e enxofre como 3.2:1. Dois nódulos observados em íntima proximidade do local de rotura demonstraram calcificação, evidenciada pelo mapeamento de raios X para cálcio (fig. 12) de um desses nódulos (fig. 13).

Ao nível de TEM, a deposição de cálcio nessas áreas foi confirmada pela presença de focos pleomórficos. Nem todos os nódulos encontrados sobre a superfície do tecido descolado mostraram calcificação, se bem que ao exame a olho nu e com a SEM eles parecessem semelhantes. Notou-se que essas estruturas nodulares eram massas de hemácias ou fibras de tecido conectivo cobertas por camadas de fibrina. A microanálise de raios X em quaisquer das áreas das válvulas de controle e das recuperadas sem rotura não demonstrou a presença de cálcio.

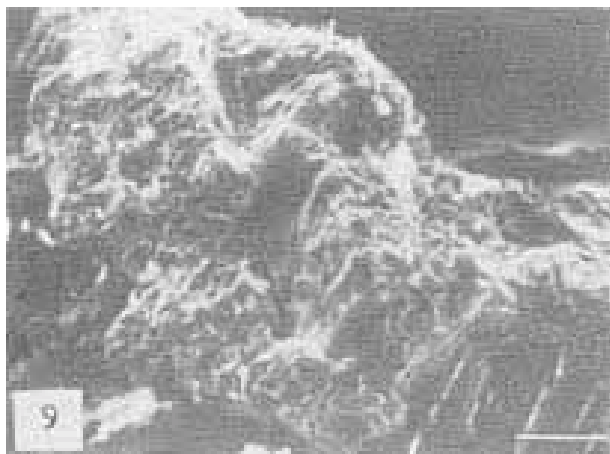


Fig. 9 - SEM ao longo da área descolada da válvula. Notar a borda rota, áspera e irregular. Espécime coberto de carbono. Linha = 300 µm.

DISCUSSÃO

Não haviam sido descritos ainda os aspectos subcelulares da dura-mater homóloga utilizada na feitura

de próteses. Conceição e col.¹² mostraram apenas as alterações macroscópica, e histológicas que ocorrem após implantação por variável período de tempo. Relataram a nor-

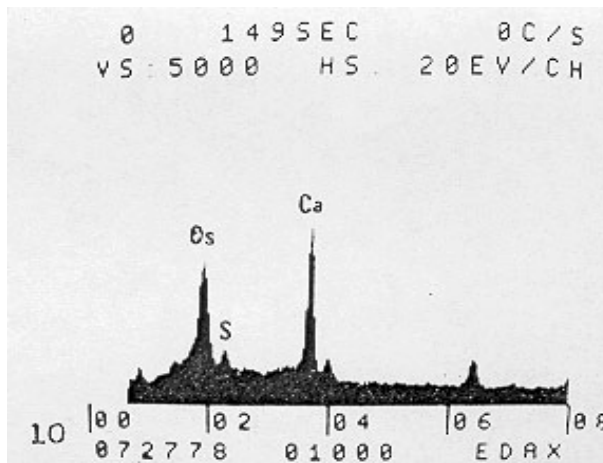


Fig. 10 - Espectro de raios X da figura 9. Cálcio (Ca), enxofre (S) e ósmio (Os) com seus ápices indicados.

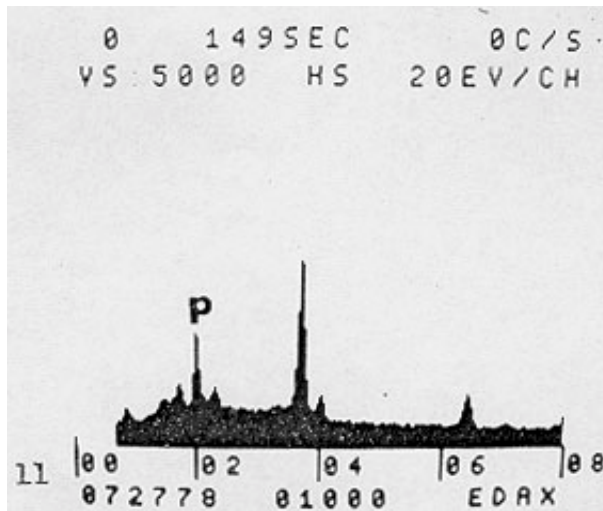


Fig. 11 - Espectro de raios X da figura 9, após eliminação de ósmio. Notar o ápice do fósforo (P) previamente oculto no ápice de ósmio.



Fig. 12 - TEM de área nodular mostrando espículas pleomórficas de cálcio. Linha = 1 µm.

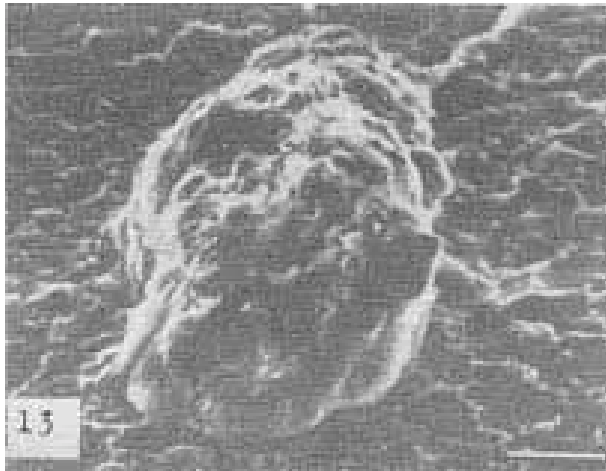


Fig. 13 - Maior aumento de nódulo da superfície de válvula aórtica recuperada. Cobertura de carbono. Linha = 50 μ m.

malidade macroscópica do tecido em relação à sua espessura e flexibilidade. Histologicamente, mostraram uma fina camada de tecido conectivo fibroso superficial, alguns histiócitos, pequenos depósitos de fibrina e nenhuma indicação de deterioração colágena. O presente estudo revelou que o exame macro fotomicroscópico das válvulas de dura-máter é inadequado para determinar o grau de preservação dos elementos celulares ou a integridade estrutural das fibras do tecido conectivo.

Assim, ficou evidenciado que as válvulas de dura-máter homóloga apresentam modificações estruturais subcelulares após serem implantadas por longos períodos de tempo, tendo sido encontradas áreas degenerativas e proliferativas em todos os espécimes examinados. Fica, no entanto, para ser demonstrado se essas alterações são parte do mecanismo normal de restauração, devido ao "wear and tear" diário das válvulas, ou de uma seqüência degenerativa - restauradora (remodelagem) que se iniciou no momento da implantação.

A SEM da dura-máter retirada de cães após perfusão¹⁴ revelou em geral uma camada ininterrupta de células achatadas sobre a superfície meníngea (face aracnóide). A superfície periostal da dura-máter é quase sempre mais áspera do que superfície meníngea, visto que algumas células se perdem quando a membrana é liberada da superfície interna do crânio. As duas válvulas não implantadas, quando comparadas com as de controle, mostraram pequenos sinais de destruição celular tanto na superfície ventricular quanto na aórtica, o que pode ser devido a forças puramente mecânicas (manipulação) durante a feitura das válvulas, ou à autólise. Em contraste, o tecido das válvulas implantadas mostrou perda completa de todas as células meníngeas de ambas as superfícies, que se encontram recobertas por camada descontínua de variável quantidade de fibrina

Em áreas não recobertas por fibrina, notaram-se finos e grossos feixes de fibras conectivas. Contrariamente às observações publicadas sobre a válvula de porco de Hancock⁸, a superfície de deflúvio das válvulas implantadas era tão ou mais áspera do que a da superfície

de impacto.

Embora as alterações da superfície observadas no presente estudo sejam semelhantes em muitos aspectos àquelas descritas nas válvulas de porco de Hancock⁸, as alterações teciduais da dura-máter, após implantação, são bastante diferentes: 1) macrófagos penetram profundamente na espessura valvular; 2) presença em todas as válvulas de fagocitose do colágeno por macrófagos; 3) presença de numerosas células, bem conservadas, com caracteres morfológicos de fibroblastos; 4) sinais de adaptação do supercrescimento observados ao longo da borda livre (de corte) em várias válvulas; 5) presença de matriz colágena estruturalmente normal, circundada por áreas de fibrilas colágenas em degeneração.

Tendo sido demonstrado que fibras colágenas nuas podem favorecer a agregação de plaquetas¹⁵, a ausência de trombos ou plaquetas nas superfícies valvulares de dura-máter implantadas é um aspecto que merece ser salientado. Achados semelhantes nas válvulas de Hanrada, um fixador, mas um agente desidratante, e cock⁸ foram atribuídos principalmente à fixação em glutaraldeído. A glicerina não é considerada um fixador, mas um agente desidratante e sabe-se que células e tecidos conservados em glicerina permanecem viáveis durante longos períodos de tempo. Pigossi¹⁶ demonstrou que a glicerina reduz a antigenicidade da dura-máter. Portanto, a conservação de válvulas de dura-máter em glicerina poderia ser responsável não somente pela antigenicidade reduzida mas também pela presença de fibroblastos e macrófagos viáveis na espessura do tecido.

A deposição lipídica encontrada principalmente na espessura das válvulas entre fibras colágenas, pode ser uma reação à modelagem e talvez o passo inicial para a calcificação¹⁷ nas áreas de descolamento.

A calcificação de nódulos sobre a superfície, ao longo da borda descolada, pode resultar em flexibilidade diminuída ou, o que é mais grave, em rotura do tecido.

Antes de invocar o papel do processo remodelador, é essencial encetarmos um estudo em seqüência cronológica, para determinar se essas implantações valvulares sofrem gradual e progressivamente deterioração antes de 44 meses, o que forneceria conhecimento mais profundo da natureza das alterações morfológicas.

O presente estudo das válvulas aórticas de dura-máter implantadas demonstra que células viáveis (macrófagos) estão presentes. Elas podem ser responsáveis pela fagocitose e substituição (modelagem) do colágeno, o que conferiria maior durabilidade às válvulas.

Conclui-se que é necessário o estudo eletromicroscópico para avaliar as condições dos tecidos naturais para estabelecer a conveniência de sua utilização em cirurgia cardíaca.

SUMMARY

Ten malfunctioning dura mater aortic prosthesis, excised surgically after 44 to 54 months of implantation were studied through transmission and reflection electron microscopy and X-ray microanalysis. Dura mater extracted at necropsy but not utilized for valve prosthesis and dura mater

aortic prosthesis not implanted in patients were used as controls.

Studies of the ten dura mater prosthesis showed: macrophages penetrating deep into the valve tissue with collagen phagocytosis; several well-preserved cells with morphologic characteristics of fibroblasts; signs of adaptation to overgrowing observed in the free edge of several valves; presence of structurally normal collagen matrix surrounded by areas of degenerating collagen fibrils.

It was therefore demonstrated that homologous dura mater valves present sub-cellular changes 44 to 54 months following implantation, with degenerating and proliferating areas which could correspond either to normal adaptation or consequence of degeneration-rebuilding (remodeling) which begins with implantation; it is also emphasized the need for ultramicroscopic studies in evaluating biological tissues and establishing its applicability in cardiac surgery.

REFERÊNCIAS

- Hufnagel, C. A.; Harvey, W. P. - The surgical correction of aortic regurgitation. *Bull. Georgetown Univ. Med. Ctr.* 6: 60, 1953.
- Ross, D. N. - Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet*, 2: 487, 1962.
- Barrat-Boyes, B. G. - Homograft aortic valve replacement in aortic incompetence and stenosis. *Thorax*, 19: 131, 1964.
- Ionescu, M. I.; Pakrashi, B. C.; Mary, D. A. S.; Bartek, I. T.; Wooler, G. H. - Long-term evaluation of tissue valves. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 68: 361, 1974.
- Puig, L. B.; Verginelli, G.; Kawabe, L.; Melo, R.; Conceição, A.; Bittencourt, D.; Zerbini, E. J. - Four years experience with dura mater cardiac valves. *J. Cardiovasc. Surg.* 18: 247, 1977.
- Zuhdi, N.; Hawley, W.; Voehl, V.; Hancock, W.; Carey, J.; Greer, A. - Porcine, aortic valve as replacements for human heart valves. *Ann. Thorac.* 17: 479, 1974.
- Gonzalez-Lavin, L.; Geens, M.; Ross, D. N. - Pulmonary valve autograft for aortic valve replacement. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 60: 322, 1970.
- Ferrans, V. J.; Spray, T. L.; Billingham, M. E.; Roberts, W. C. - Structural changes in glutaraldehyde-treated porcine heterografts used as substitute cardiac valves. *Cardiol. Am. J. Cardiol.* 41: 1159, 1978.
- Ashraf, M.; Bloor, C. M. - Structural alterations of the porcine heterograft after various durations of implantation. *Cardiol. Am. J. Cardiol.* 41: 1185, 1978.
- Weeler, E. E.; Gavin, J. B.; Herdson, P. B. - A SEM study of human heart valve allografts. *Path.* 4: 185, 1971.
- Willen, R.; Dubiel, W. T. - Viability and surface properties of autologous fascia lata heart valve grafts. *Ann. Thorac. Surg.* 18: 597, 1974.
- Conceição, A.; Puig, L. B.; Verginelli, G.; Iryia, K.; Bittencourt, D.; Zerbini, E. J. - Homologous dura mater cardiac valves: Structural aspects of eight implanted valves. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 70: 499, 1975.
- Karnovsky, M. J. - A formaldehydegutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27: 137 A, 1965.
- Allen, D. J.; DiDio, L. J. A. - Scanning and transmission electron microscopy of the encephalic meninges in dogs. *J. Submicro. Cytol.* 9: 1, 1977.
- Simons, E. R.; Chesney, C. M.; Colman, Harper, E.; Samberg, E. - The effect of the conformation of collagen on its ability to aggregate platelets. *Thromb. Res.* 7: 123, 1975.
- Pigossi, N. W. - Uso da glicerina na preservação da dura-mater: Estudo experimental. Tese de livre docência, Faculdade de Medicina da USP. 1967.
- Wuthier, R. E.; Irving, J. T. - A study of the lipids of the rat aorta during induced calcification. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130: 156, 1969.