

AMILOIDOSE E INFLAMAÇÃO EM VALVAS MITRAIS CALCIFICADAS DE PACIENTES REUMÁTICOS CRÔNICOS

RAIMUNDA VIOLANTE CAMPOS DE ASSIS, MAX GRINBERG, EDGARD A. LOPES, LUIZ V. DÉCOURT, CARLOS EDUARDO PEREIRA CORBETT, FÚLVIO PILEGGI, ADIB D. JATENE

De um total de 225 valvas mitrais obtidas cirurgicamente de pacientes reumáticos em fase de quiescência clínica foram selecionadas 70 que apresentavam calcificação. Estas foram analisadas histológica e histoquimicamente para avaliação da existência ou não de correlação entre calcificação, inflamação e depósito amilóide. Como controle, foram estudadas 20 valvas que não apresentavam calcificação.

Observou-se infiltrado inflamatório moderado ou intenso em 59 (84,2%) valvas e discreto ou ausente em 11 casos (15,8%), sempre em íntima relação com as áreas de calcificação. A pesquisa para amilóide feita pela coloração do vermelho Congo mostrou-se positiva em 47 (67,1%) das 70 valvas com calcificação, sendo que 44 (93,6%) apresentavam intenso infiltrado inflamatório, sempre próximo à calcificação. Apenas três valvas

apresentavam amilóide junto as áreas calcificadas, sem inflamação adjacente. No grupo controle, a pesquisa para amilóide foi negativa em todos os casos. A análise ao microscópio eletrônico de duas valvas com calcificação mostrou presença de elementos fibrilantes muito semelhantes a filamentos do tipo intermediário em localização extracelular.

O presente trabalho demonstrou evidente associação entre inflamação, calcificação e depósito amilóide em valva mitral cronicamente lesada pela doença reumática. Sugere-se que a inflamação deve desempenhar papel relevante na progressão das lesões valvares crônicas de etiologia reumática, favorecendo a deposição extracelular do citoesqueleto, ulterior amiloidose e calcificação.

Arq. Bras. Cardiol. 51/6: 433-436—Dezembro 1988

A presença de zonas calcificadas em valvas mitrais com lesões reumáticas crônicas tem sido discutida em alguns estudos¹⁻³. O papel da amiloidose, em geral referida como distrófica, já foi objeto de análise na patogênese dessa calcificação³⁻⁵. Alguns autores^{4,5} avaliaram a possibilidade de participação do citoesqueleto na gênese dessa amiloidose.

Chopra e col⁷, estudando valvas mitrais reumáticas, discutiram a presença de infiltrado inflamatório relacionado à calcificação local, levantando hipótese de processo imunitário atual, relacionado a antígeno residual. Não houve, entretanto, qualquer referência a depósito amilóide.

Estudo com tipagem de linfócitos em valva reumática crônica⁹ sugeriu que infiltrado linfocitário valvar estaria envolvido ativamente no processo de fibrose e, por isso, na gênese da seqüela valvar.

No presente estudo a partir de espécimes valvares, removidos de pacientes com história de doença reumática crônica (DR) submetidos a troca da valve mitral,

procuramos analisar a interrelação entre calcificação, infiltrado inflamatório e amiloidose.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinadas 225 valvas mitrais ressecadas cirurgicamente de pacientes operados entre 1978 e 1983 no Instituto do Coração da FMUSP. Todos os enfermos mencionavam história pregressa de DR mas não apresentavam quaisquer sinais clínicos ou laboratoriais de atividade atual.

As idades dos pacientes oscilaram entre 11 e 62 anos (média 35 anos), encontrando-se 75,7% entre os 30 e os 50 anos.

Os aspectos anatomo-patológicos macro e microscópicos superpunham-se às clássicas descrições da literatura^{2,9}.

Foram selecionadas para o presente estudo todas as valvas que estavam calcificadas (em número de 70) e mais 20 não calcificadas, que serviram como grupo controle.

Os cortes histológicos representativos de todas as cúspides foram processados de maneira convencional, embebidos em parafina. Foram feitas as colorações de hematoxilina-eosina (HE) em cortes de 4 mm de espessura e de vermelho Congo em cortes de 8 mm, segundo método de Puchtler¹⁰. Nas valvas calcificadas, seus fragmentos foram previamente descalcificados em solução de partes iguais de ácido fórmico a 50% e de citrato de sódio a 20%.

Avaliou-se a presença de infiltrado inflamatório e sua relação com as zonas calcificadas, designandose-o como discreto (+), moderado (++) e intenso (+++).

Ulteriormente, as valvas foram agrupadas em categorias, segundo a intensidade da inflamação presente na área calcificada.

Duas valvas forneceram fragmentos que foram fixados em glutaldeído a 2,5%, pós fixados em tetróxido de ósmio a 1% e acetato de uranila a 0,5%, desidratados em etanol e embebidos em "spur". Obtiveram-se, assim, secções ultrafinas (600—800 Å) que, coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo, foram examinadas em microscópio eletrônico, Philips EM-301.

RESULTADOS

De acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório presente nas zonas calcificadas, os espécimes puderam ser distribuídos em três grupos histológicos: 1) grupo A, no qual áreas calcificadas se mostravam envolvidas por infiltrado inflamatório moderado ou intenso: 59 (84,2%) casos, que exibiam infiltrado constituído por linfócitos, plasmócitos e macrófagos. As áreas calcificadas, neste conjunto, mostravam, em geral, forte tonalidade eosinófila pela HE após descalcificação. O infiltrado, sempre observado nas proximidades dessas áreas, formavam por vezes, lingüetas que penetravam nos blocos calcificados isolando-os em pequenos núcleos (fig. 1-A). 2) Grupo B, no qual havia apenas discreta reação inflamatória nas zonas vizinhas às calcificações: 3 (4,2%) casos. As valvas deste grupo apresentavam zonas calcificadas densas, por vezes com basofilia acentuada e disposição lamelar, circundadas por fibroblastos, macrófagos e raros linfócitos (fig. 2). 3) Grupo C, no qual as valvas calcificadas não apresentavam qualquer infiltrado inflamatório: 8 (11,4%) casos, onde os blocos calcificados ou pontos basofílicos tinham disposição e extensão semelhante às do grupo B (fig. 3).

Em 47 (67,1%) das 70 valvas calcificadas, depósitos amilóides, corados pelo vermelho Congo, apresentavam discroísmo verde à luz polarizada (fig. 1B). Nas 20 peças sem calcificação esta pesquisa mostrou-se negativa. Os depósitos de amilóide situavam-se sempre nas proximidades de áreas calcificadas, onde a valva se mostrava esclerosada. Raramente foram observados acúmulos amilóides afastados das calcificações. Além disso, depósitos de substância congofílica foram

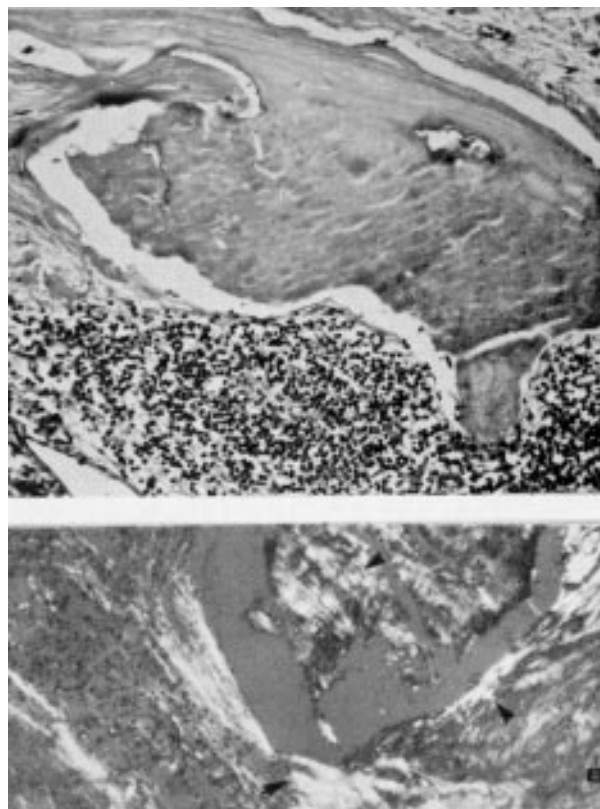


Fig. 1 — A — Caso do Grupo A. Fotomicrografia de um campo mostrando calcificação valvar acompanhada de infiltrado inflamatório intenso, constituído por linfócitos, plasmócitos e macrófagos que, por vezes, "invadem" blocos de calcificação. HE x 160 B — área de calcificação, inflamação e amilóide (setas). V. Congo-luz polarizada, x 160.

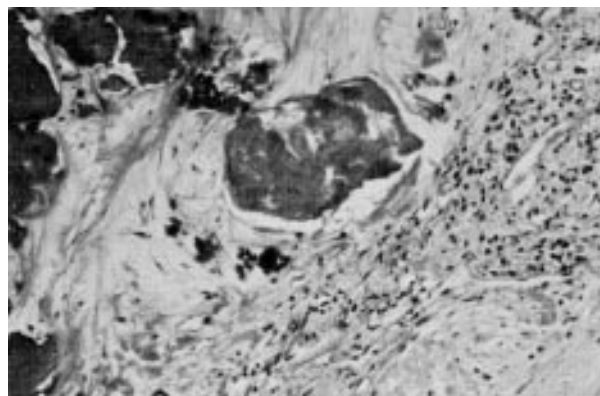


Fig. 2 — Caso do grupo B, no qual o infiltrado inflamatório peri-calcificação é discreto. HE, x 160.

encontrados com frequência na intimidade da área calcificada. No interior dos focos de infiltrado inflamatório linfocitário mais denso, no entanto, não se encontravam acúmulos amilóides. Em zonas menos "inflamadas" os fibroblastos e os macrófagos tinham habitualmente núcleo irregular com cromatina frouxa, citoplasma "alargado" e discretamente rendilhado, com limites pouco precisos.

Das 47 valvas com amiloidose, 44 (93,6%) correspondiam a fragmentos com moderado ou intenso infiltrado inflamatório e calcificação. Apenas três (6,3%) incluíam-se no grupo das valvas com calcificação sem

reação inflamatória. Por outro lado, 44 (74,5%) das 59 valvas com calcificação e infiltrado importante (grupo A), apresentavam amiloidose.

Em fragmentos das duas valvas enviadas para análise em microscopia eletrônica, observou-se presença de células, geralmente fibroblastos degenerados, que mostravam em seu citoplasma filamentos do tipo intermediário (fig. 4-A). Na matriz, com abundantes fibrilas colágenas elásticas e blocos de cálcio, foram encontradas fibrilas retas, não ramificadas, às vezes entrelaçadas, lembrando os filamentos vistos dentro das células (fig. 4-B).

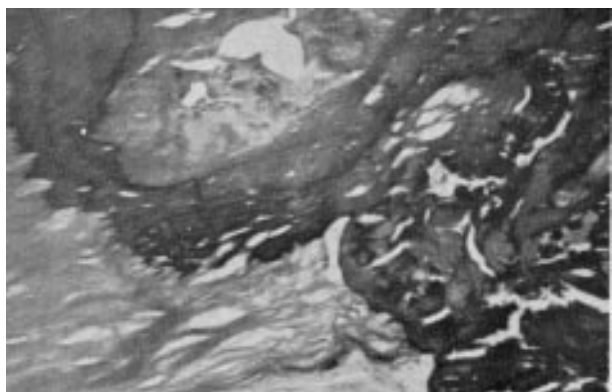


Fig. 3 — Caso do grupo C, com blocos extensos de cálcio e ausência de inflamação, HE, x 160.

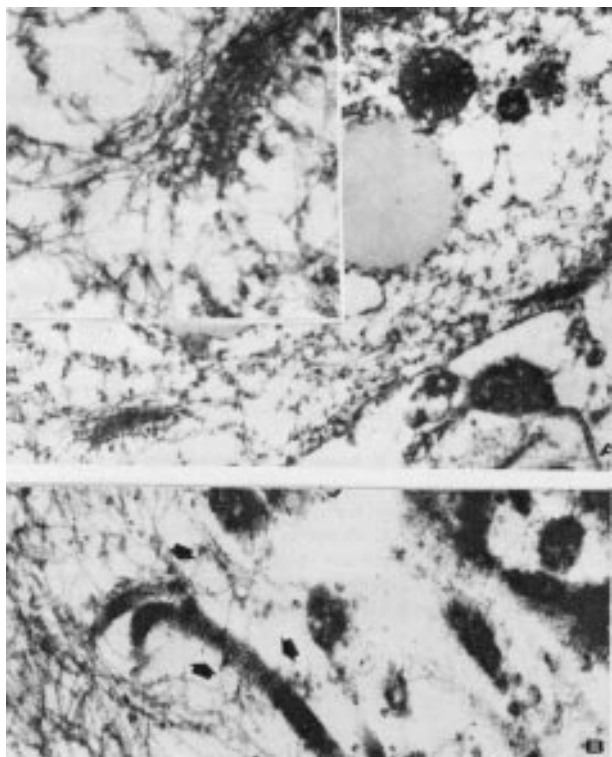


Fig. 4 — A — Microscopia eletrônica de um caso com amiloidose valvar. Célula intensamente degenerada com vacúolos de gordura e focos de filamentos semelhantes aos filamentos do tipo intermediário. Acima e à esquerda, detalhe dos filamentos. B — substância extracelular, notando-se bloco calcificado acima e à direita, fibras colágenas (setas), elementos fibrilares entrecruzados morfológicamente semelhantes aos filamentos intermediários. ME x 120.000

DISCUSSÃO

A associação entre amiloidose e calcificação distrófica já foi observada em determinadas entidades patológicas valvares³⁻⁵. Tanto Goffin³ quanto Cooper⁴ incluem a valvopatia reumática crônica no grupo acima citado. A possibilidade de que esta amiloidose preceda à calcificação valvar é aventada por vários autores³⁻⁵. Em nosso material, a elevada incidência de depósitos amilóides em valvas calcificadas fala a favor desta teoria. Entretanto, à semelhança de outros tipos de amiloidose^{11,12}, esperaríamos encontrar valvas cronicamente lesadas com amiloidose e sem calcificação, mas isto não foi observado.

Na patogênese da amiloidose valvar propõem-se duas condições: deposição de precursor de amilóide circulante favorecida por fatores localizados na valva⁵ e produção e deposição local de amilóide nas valvas cardíacas^{4,5}. A primeira possibilidade está calcada na teoria sobre a gênese geral das fibrilas amilóides, tanto as derivadas da proteína AA quanto das imunoglobulinas¹³. Em ambos os tipos de amiloidose existe um precursor circulante. Até agora, entretanto, não se documentou o encontro de um precursor para a amiloidose valvar. Na segunda teoria, o processo amiloidogênico seria desencadeado pela degeneração dos fibroblastos, proliferados no início do processo fibrótico, com grande depósito de citoesqueleto na matriz valvar^{4,5}. Esta mesma teoria apóia-se no trabalho de Linder e col⁵ que considera que citofilamentos de fibroblastos são ultraestruturalmente indistinguíveis de fibrilas amilóides e que, sob certas circunstâncias, os filamentos intermediários desses fibroblastos apresentam afinidade pelo vermelho Congo com dicromismo verde à luz polarizada. A questão é saber se o citoesqueleto, mesmo sendo resistente, permanece na matriz extracelular após destruição das células. Além disso, seria necessário, à luz dos conhecimentos atuais¹³, que este esqueleto celular assumisse configuração espacial de fitas entrelaçadas "b-plaeted", para adquirir a propriedade de corar-se pelo vermelho Congo¹³. Este conceito de natureza física do depósito amilóide, foi muito bem estudado por Glenner¹³, em recente revisão sobre o assunto. Ele propõe que o processo de amiloidose passe a se chamar de beta-fibrilose. Cremos que o esqueleto celular participe de fato do processo na amiloidose valvar da DR. Nos dois casos submetidos à análise em microscópio eletrônico, ficou evidente que a matriz extracelular exibia filamentos semelhantes aos encontrados dentro das células profundamente alteradas.

A associação muito freqüente (74,5%) de amiloidose, calcificação e infiltrado inflamatório, observada em nossa série, leva-nos a pensar que, na valvopatia reumática crônica, o processo inflamatório se inclui na gênese dessa amiloidose. Um mecanismo a ser proposto é a participação de imunoglobulinas originadas de processo imunitário local desencadeado por algum tipo de antígeno residual. Chopra-e col⁷ pensaram em um processo imunitário atual pela frequente associa-

ção entre calcificação e inflamação em valvas mitraes reumáticas crônicas. Nesta publicação, entretanto, os autores não mencionam amiloidose. A possibilidade de ocorrência de processo imunitário (imunoglobulinas) encontra apoio na concepção atual da patogenia da DR. De fato, há evidências de reações imunitárias cruzadas (mímica biológica) entre tecidos cardíacos humanos e componentes do estreptococo beta-hemolítico^{14,15}.

Outro mecanismo pare amiloidogênese valvar excluiria imunoglobulinas, direcionando o processo para os linfócitos T. Raizada e col⁸ estudaram a distribuição de linfócitos em valvas reumáticas com anticorpos monoclonais e estabeleceram que 70% a 80% dos linfócitos presentes na lesão valvar crônica são do tipo T e a maioria do tipo "Helper/Inducer", que acreditam estejam envolvidos na fibrogênese. Julgamos que a população de linfócitos presente no processo que envolve calcificação e amiloidose, nas valvas mitraes reumáticas crônicas, posse ser o elo de interação entre macrófago e fibroblastos locais na gênese da amiloidose, via deposição de citoesqueleto.

Em conclusão o presente trabalho demonstrou a freqüente associação entre inflamação, calcificação e amiloidose em valvas mitraes de natureza reumática crônica. A análise em microscopia de luz e eletrônica sugere que o processo inflamatório linfocitário teria participação fundamental no desenvolvimento da amiloidose, possivelmente pela deposição de citoesqueleto na matriz extracelular.

SUMMARY

Out of 225 mitral valves surgically removed from rheumatic patients, in quiescent phase, were selected 70 which showed calcifications. The histological and histochemical study was made to evaluate the correlation of calcification, inflammation and amyloid deposits. Twenty valves free from calcification were studied as control specimens.

The inflammatory infiltrate was moderate or severe in 59 (84,2%) cases and mild or absent in 11 (15,8%) out of 70 valves studied. The distribution of such infiltrate had always close relationship to calcified areas.

Amyloid deposits were searched using the alkaline Congo red stain and were found in 47 (67,1%) of all calcified valves, 93,6% presenting severe inflammatory infiltrate peripherally to calcified zones. On the other hand, only 3 calcified valves showed amyloid deposits

without inflammation. Amyloid deposits were absent in the 20 non-calcified control valves.

Electron microscopic examination performed in calcified valves revealed fibrillar structures analogous to intermediate filaments both in the cytoplasm of cells and in the extracellular matrix.

The present report support the evidence of close association between inflammation, calcification and amyloidosis in heart valves from patients with chronic rheumatic disease. The authors suggest that the inflammation plays a considerable role in the progression of the chronic rheumatic valvopathy, favouring the extracellular deposition of the cytoskeleton and, late on, leading to amyloidosis and calcification.

REFERÊNCIAS

1. Davies MJ—Pathology of Cardiac Valves, London, Butterworth and Co., 1980. p. 105.
2. Pomerance A, Davies MJ—The Pathology of the Heart. Oxford, London, Blackwell Scientific Publications, 1975. p. 308/
3. Goffin Y— Microscopic amyloid deposits in the heart valves: a common local complication of chronic damage and scarring. J Clin Path, 83: 262,1980.
4. Cooper JH—Localized dystrophic amyloidosis of heart valves. Hum Path, 14: 649,1983.
5. Falk E, Ladefoged C, Christensen HE—Amyloid deposits in calcified aortic valves. Acta path microbiol scand Sect A, 89: 23, 1981.
6. Linder E, Lehto VP, Virtanen I—Amyloid-like birefringence in cytoskeletal 10 nm filaments after staining with Congo red. Acta path microbiol scand Sect A, 87: 299, 1979.
7. Chopra P, Tandon HD, Raizada V, Butler O, Williams Jr RC— Apparent chronic immune reaction associated with mitral valve calcification in rheumatic heart disease. Clin Res, 30: 5A, 1982.
8. Raizada V, Williams RC, Chopra P, Gopinath N, Prakash K et al— Tissue distribution of lymphocytes in rheumatic heart valves as defined by monoclonal anti-T cell antibodies. Am. J Med, 74: 90, 1983.
9. Hudson REB—Cardiovascular Pathology, London, Edward Arnold. 1965. vol. 1 p. 969.
10. Puchtler H, Sweet F, Levine M—On the binding of Congo red by amyloid. J Histochem Cytochem, 10: 355,1962.
11. Ranlov P, Pindborg JJ—The amyloid nature of the homogeneous substance in the calcifying epithelial odontogenic tumor. Acta path microbiol scand, 68:169, 1966.
12. Symmers W St C—Primary amyloidosis. A review. J clin Path, 9: 187, 1956.
13. Glenner GG—Amyloid deposits and amyloidosis. N. Engl J Med, 32: 1283, 1980.
14. Goldstein I, Halpern B, Robert L—Immunological relationship between streptococcus A polysaccharide and the structural glycoproteins of heart valve. Nature, 213: 44, 1967.
15. Halpern B, Parlebas J, Goldstein I—Isolement a partir du cytoplasme du streptocoque A d'une glycoprotéine que présente une parenté immunologique avec des glycoprotéines des valves cardiaques, CR Acad Sci (Paris), 273: 995, 1971.