

Determinación de la densidad y heterogeneidad de la angiogénesis en la valvulitis crónica reumática

Drs. María Valentina Díaz Ruiz *, Claudia Antonieta Blandenier de Suárez*, Ernesto Trejo**, Leticia Hamana de Ramírez*

* Instituto Anatomopatológico “Dr. José Antonio O’Daly”. UCV.

** Cátedra de Patología General y Fisiopatología. Escuela de Medicina Luis Razetti. UCV.

RESUMEN

En los países en desarrollo la fiebre reumática constituye aún, un problema de salud. La valvulopatía reumática es grave porque amerita en la mayoría de los casos, reemplazo valvular afectando inclusive a pacientes adolescentes y en la edad media de la vida. La evolución de la lesión valvular es progresiva con remodelado fibroso de sus estructuras. Histológicamente, la densidad de la neovascularización es variable y heterogénea dependiente de diferentes factores de crecimiento.

El objetivo fue determinar la densidad y heterogeneidad de la angiogénesis o neovascularización en tres etapas de progresión de la valvulitis crónica reumática y su relación con la fibrosis e inflamación.

Se realizó análisis histopatológico e inmunohistoquímico de 60 biopsias de pacientes con reemplazo valvular mitral, de ambos sexos divididos en tres grupos que caracterizan etapas de progresión de la valvulitis crónica. Se estimó la densidad de cada tipo de neovasos en las valvas y su relación con el grado de inflamación y fibrosis de la valva.

Los promedios de edades de los grupos 1, 2 y 3 fueron: 15,3 ± 0,6; 31 ± 1,5 y 49,7 ± 1,4 años, respectivamente. La densidad total (vasos/mm²) de la angiogénesis fue decreciente desde el grupo 1 al 3; 14,78 ± 1,92, 5,98 ± 1,08 y 3,55 ± 0,76, respectivamente. (P < 0,001. ANOVA F = 19,162). El neovaso predominante fue el “vaso madre”, estructura transitoria que evoluciona a las formas intermedias y a las más estables (vasos “hijos” y vasos con pared muscular).

La presencia de la variabilidad de la densidad neovascular y la heterogeneidad de los neovasos en la etapa crónica de la valvulopatía reumática en relación con el proceso inflamatorio y de cicatrización, puede ser explicada por la acción de diferentes factores de crecimiento.

Palabras clave: Fiebre reumática. Valvulopatía reumática. Enfermedad cardíaca reumática.

SUMMARY

In the developing countries the rheumatic fever still constitutes a health problem. The rheumatic valvulopathy is serious because in most of the cases replacement of the affected valve is needed, including adolescent patients and in the average age of the life. The evolution of the valvular lesions is progressive with fibrous remodeling of the structures. Histologically the angiogenesis density is variable and heterogeneous depending on different growth factors.

The objective was to determine the angiogenesis density and heterogeneity in three stages of progression of the rheumatic chronic valvulitis and their relation with the fibrosis and inflammation.

Histopathologic and immunohistochemical analysis of 60 biopsies was done on patients with replacement of the mitral valve, of both sexes, divided in three groups that characterize stages of progression of the chronic valvulitis. Each type of neovasculature’s valvular density and its relation to the inflammation and fibrosis degree was estimated.

The age averages of groups 1, 2 and 3, were: 15.3 ± 0.6; 31 ± 1.5 and 49.7 ± 1.4 years, respectively. The total angiogenesis, density (vasos/mm²) decreased from group 1 to the 3; 14.78 ± 1.92; 5.98 ± 1.08 and 3.55 ± 0.76 (P < 0.001), ANOVA, F = 19.162. The predominant angiogenesis was the “mother-vase”, transitory structure that evolves to the intermediate and most stable forms: (“children vases” and “vases with muscular walls”).

The presence of the neovascular density’s variability and the heterogeneity in the chronic stage of the rheumatic valvulopathy in relation to the inflammatory and of healing process could be explained as the effect of different growth factors.

Key words: Rheumatic fever. Rheumatic heart disease. Valvular disease.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la enfermedad valvular reumática persiste en los países en desarrollo especialmente en África y resurge en EE.UU (1). En nuestro país, constituye un problema de salud y es la primera causa de reemplazo valvular en el Hospital Universitario de Caracas en pacientes jóvenes e inclusive en escolares (2). Se señala como la causa más importante de cardiopatía adquirida en niños y adultos jóvenes (3).

En nuestro medio, el estudio anatomopatológico de la valvulitis crónica reumática mitral ha sido abordado desde varios puntos de vista. Sin embargo, no se ha publicado aún la heterogeneidad de la angiogénesis en las diversas etapas de progresión de esta valvulopatía (4,5).

Las alteraciones inflamatorias de la valvulitis reumática se expresan más frecuentemente en la matriz extracelular del endocardio de las valvas. Algunos investigadores han indicado que los anticuerpos contra la miosina y el carbohidrato del grupo A del *Streptococo B- Hemolítico*, juegan un papel importante en el daño del endotelio de la superficie valvular siendo la laminina, secretada por las células endoteliales, el blanco de una reacción cruzada con el anticuerpo antiestreptocócico y antimiosina (6,7).

La respuesta inflamatoria inespecífica del tejido valvular ante los ataques recurrentes de fiebre reumática (FR), es primeramente, vascular (edema, neovascularización con permeación capilar, arteriolar y venular,) y celular (infiltrado inflamatorio predominantemente mononuclear). La reacción celular puede ser específica conformando la lesión granulomatosa de Aschoff propia de la inflamación tisular reumática (8). Posteriormente, sobreviene el proceso de cicatrización o curación (fibrosis) y eventualmente, calcificación (9).

La neovascularización o angiogénesis ocupa un primer lugar entre los fenómenos vasculares del proceso inflamatorio. Consideramos importante el estudio novedoso de la angiogénesis en las valvas mitrales reumáticas, su caracterización y relación con la progresión de las lesiones inflamatorias y de remodelación colágena durante las diferentes etapas de la enfermedad. Previamente, hemos realizado estudios sobre este aspecto, pues la angiogénesis es un factor tisular que contribuye de forma importante a la perpetuación de los fenómenos inflamatorios y de cicatrización (fibrosis) de los elementos anatómicos de los aparatos valvulares mitral y tricúspideo y

eventualmente, de las válvulas sigmoideas (válvulas aórticas y más raramente, de las pulmonares) (10). Sin embargo, no habíamos realizado un análisis puntual sobre los diferentes aspectos morfológicos que pueden adoptar los neovasos en cada estado evolutivo de la valvulopatía reumática.

Experimentos en modelos animales, han demostrado que el factor de crecimiento endotelial A (VEFG-A), produce una respuesta heterogénea en la formación de los neovasos. Esto significa, que la angiogénesis no sólo está formada por capilares o vénulas, sino que presenta una diferenciación vascular determinada por factores de crecimiento diferentes. Los neovasos presentan varias formas que indican una actividad angiogénica transitoria. La presencia y variación de los diversos tipos de neo vasos, puede señalar indirectamente, factores de crecimiento o de citoquinas conocidos que intervienen en su formación, los cuales pueden constituir eventualmente, un blanco terapéutico. Los inhibidores de la angiogénesis, en un momento dado, podrían disminuir o evitar la progresión de las lesiones inflamatorias y del remodelado colágeno, los cuales son en definitiva, la causa de la disfunción valvular (11).

El objetivo de este trabajo es determinar la densidad y la caracterización morfológica o la heterogeneidad de los neovasos en varias etapas del proceso inflamatorio reumático valvular.

MATERIAL Y MÉTODO

Población y muestra

Se evaluaron 60 biopsias diagnosticadas anatomopatológicamente como valvulitis reumática crónica y/o de secuela de valvulitis crónica reumática. Los casos fueron seleccionados del total de biopsias (n=2234) de la Sección de Patología Cardiovascular del Instituto Anatomopatológico "José A. O'Daly", durante el período 1986-2004. Para el estudio planteado, se tomaron las biopsias del aparato valvular mitral aislado o con válvulas aórticas y/o tricúspideo, por ser la estructura primeramente afectada por el proceso reumático.

Esta población fue dividida en tres grupos de 20 biopsias cada uno, con características propias de tres estados de progresión del daño valvular. Se consideró que cada grupo de edad de los pacientes, era representativo de tres fases de progresión de la valvulitis crónica reumática: grupo 1, de la fase inicial (pacientes con edades igual o menor de 20 años); grupo 2, de la fase terminal, (pacientes con edades

entre 21 y 40 años de edad) y grupo 3, de la fase de transición y/o de secuela de la valvulitis crónica (en pacientes mayores de 40 años de edad).

Variables

En cada caso se estudiaron variables clínicas y anatomopatológicas.

Las variables clínicas fueron edad, género y diagnóstico clínico de la disfunción valvular que ameritó el reemplazo.

Las variables histopatológicas incluyeron las lesiones propias de cada etapa evolutiva de la valvulopatía reumática como lo son: la presencia o no de tejido añadido, inflamación, nódulos de Aschoff, fibrosis y neovascularización. En cuanto a ésta última, se calculó la densidad vascular total en cada muestra y la densidad de cada tipo de vasos neoformado. Igualmente, complicaciones como endocarditis infecciosa.

Procedimientos y criterios de diagnóstico

Examen microscópico al microscopio de luz: las muestras fueron procesadas según las técnicas de inclusión en parafina y las secciones teñidas con las coloraciones de hematoxilina-eosina (H&E), y tricómico de Gomori y de Van Giesson. En cada biopsia, se escogió, con aumento de 100x, las láminas que tenían el mayor número de secciones histológicas representativas del proceso patológico y mayor cantidad de neovasos

Para la gradación de la inflamación de las valvas, se utilizó una clasificación por grados: grado 1 (infiltrado inflamatorio leve en focos dispersos), grado 2 (infiltrado inflamatorio moderado en múltiples focos confluentes) y grado 3 (infiltrado inflamatorio difuso en todo el fragmento). También se consignó el tipo de células que conformaban el infiltrado inflamatorio así como la presencia de granuloma de Aschoff.

De forma similar, la fibrosis fue evaluada en: grado 1 (fibrosis leve, presente en el borde libre), grado 2 (fibrosis en el borde libre y cuerpo de la valva) y grado 3 (fibrosis en todo el fragmento).

Estudio inmunohistoquímico

En el material previamente seleccionado, se realizó la inmunohistoquímica con la técnica del polímero de dextrano conjugado al anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (sistema EnVision) y el cromógeno diaminobencidina para el inmunomarcaje con los anticuerpos primarios monoclonales de ratón anti

actina de músculo liso (IA4; Dako; 1:100) y CD34 (QEnd 10; Dako; 1:50) para identificar células endoteliales. La recuperación antigénica se efectuó por calor con una vaporera de marca comercial, durante 30 minutos, para lo cual se dejaron las láminas inmersas en solución de buffer citrato de pH 6,0, con fase previa de calentamiento de la solución recuperadora durante 20 minutos.

Cálculo de la densidad de la angiogénesis o neovascularización

Se calculó el área de las secciones histológicas inmunomarcadas en la lámina escogida de cada biopsia, utilizando el método de conteo de cuadros (“*box counting*”) para lo cual se utilizó papel milimetrado. Las secciones fueron examinadas en su totalidad, minuciosamente, a un aumento de 400x. Se contaron todos los vasos con inmunomarcaje positivo para CD34, identificando cada tipo de neovasos y las células endoteliales aisladas y posteriormente, los vasos inmunomarcados positivos con anti actina de músculo liso. El conteo se realizó con un contador manual para células hematológicas.

La densidad vascular fue calculada dividiendo el número total de vasos entre el área de cada sección histológica en mm², y fue expresada como “vasos por mm²” (vasos/mm²). Este mismo procedimiento se siguió para el cálculo de la densidad de cada tipo de neovaso.

Criterios morfológicos para la identificación de los diferentes tipos (heterogeneidad) de los vasos neoformados

Cada tipo de neovaso fue identificado y clasificado según su morfología de acuerdo con las características descritas por Petterson, Nagy y col. (11) Figura 1. Se consideró un “vaso precursor” (vénula o capilar), a un vaso de pequeño calibre con pared constituida por una capa células endoteliales y rodeada de algún(os) pericito(s); a los “vasos madres” como aquellos que presentaban un calibre mayor que el del precursor y cuya pared estaba formada únicamente por células endoteliales, sin pericitos. Se contaron también las llamadas “formas intermedias” con o sin pericitos parietales, caracterizadas por: “vasos con gemación”; “vasos con tabiques” (con puentes intra lumenales) y “vasos con intususcepción” (con invaginación de la pared). Las formas más maduras y/o estables de neo vasos presentaron además de pericitos, fibras musculares lisas propias de las arteriolas y arterias

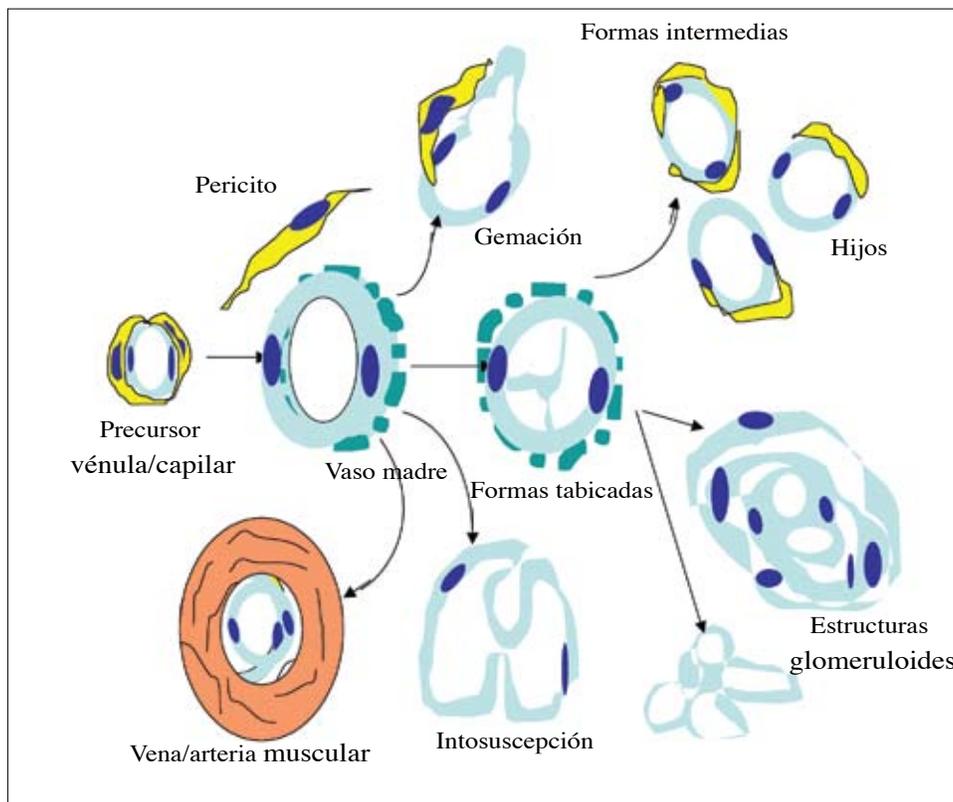


Figura 1. Esquema que ilustra la progresión y maduración del proceso de angiogénesis, desde los vasos precusores, pasando por formas transitorias (vasos madres) e intermedias, hasta las formas más estables. Según Peterson y col. (11), Nagy (29). Diseño. C Suárez

de mediano calibre. También se identificaron las estructuras “glomeruloides” (vasos con múltiples luces rodeadas por células endoteliales); los “vasos hijos” formados por grupos de tres o más vasos juntos, de pequeño calibre, con pared formada por células endoteliales y pericitos. Las células endoteliales aisladas únicas o en grupos, aun cuando difíciles de caracterizar, fueron consideradas, cuando se identificó la célula con tinción positiva citoplasmática fuerte para CD34, separada de vasos sanguíneos, en el estroma de la valva.

Tratamiento estadístico

Se analizaron las variables cuantitativas como la edad, el diagnóstico clínico funcional, el grado de inflamación y de fibrosis, densidad y heterogeneidad de la neovascularización. Se consignaron variables cualitativas como etapa de la enfermedad, y tipo de tejido conectivo. Estas variables se cruzaron entre sí y para su análisis se utilizaron diferentes pruebas

paramétricas y no paramétricas. Aplicamos la prueba de ANOVA para comparar los tres grupos diferentes según las diversas variables cuantitativas mencionadas. La prueba de ANOVA se realizó luego de determinar la distribución normal de la muestra (prueba de Kilmogorov-Smirnov). El Chi cuadrado fue usado para relacionar variables cuantitativas (grado de fibrosis, grado de inflamación) en tablas de contingencia. La “t” de Student permitió realizar comparaciones entre dos grupos, en relación con las diferentes variables cuantitativas. Además, se utilizó la media, error estándar y porcentaje para la realización de representaciones gráficas.

RESULTADOS

El grupo 1 de pacientes presentó un promedio de edad de $15,3 \pm 0,6$ años; el grupo 2, de $31 \pm 1,5$ años y el grupo 3, de $49,7 \pm 1,4$ años. La distribución de los casos según edad, género y diagnósticos clínicos

relacionados con la disfunción valvular que ameritó las resecciones quirúrgicas para la colocación de prótesis valvulares, están expuestos en el Cuadro 1. El diagnóstico predominante en el grupo 1, fue el de insuficiencia mitral, en el grupo 2, de doble lesión y en el grupo 3, de estenosis mitral. La insuficiencia mitral pura sólo se observó en cuatro pacientes jóvenes de 21 a 26 años de edad; en cambio la estenosis mitral pura, en cuatro individuos mayores de 36 años de edad. La afectación de los dos aparatos valvulares aurículo-ventriculares (mitral y tricuspídeo) y de las válvulas sigmoideas aórticas (lesión trivalvular) se observó en tres pacientes del grupo 3.

Hallazgos histológicos (microscopio de luz)

Todos los casos mostraron tejido añadido al normal, especialmente ubicado en la *pars espongiosa*

de la valva, formado por fibrosis, aumento de sustancia fundamental, infiltrado inflamatorio predominantemente linfo-mononuclear, fibras musculares lisas (85,0 %) y neovascularización. Cuadro 2. Figura 2.

En el total de las biopsias, predominó la inflamación de grado 1 (81,6 %). Los grados mayores de inflamación fueron observados en los grupos 1 y 2. Las biopsias del grupo 1 fueron las únicas que mostraron inflamación de grado 3 (15,0 %), focos de necrosis fibrinoide y nódulos de Aschoff (n=7-35,0). Las biopsias del grupo 1 tenían fibrosis de grado 2 en el 40,0 % y de grado 3 (60,0 %). En las biopsias del grupo 2, predominó la fibrosis de grado 3 (80,0 %) y en el grupo 3, todos los casos presentaron fibrosis severa (grado 3). La presencia de focos de calcificación

Cuadro 1

Valvulitis reumática crónica: datos clínicos

VARIABLES	Grupo 1 20 (%)	Grupo 2 20 (%)	Grupo 3 20 (%)	Todos 60 (%)
Edad (media aritmética ± EE)	15,3±0,6	31,0±1,5	49,7±1,4	32,0±1,9
Género				
Masculino	7 (35,0)	5 (25,0)	6 (30,0)	18 (30,0)
Femenino	13 (65,0)	15 (75,0)	14 (70,0)	42 (70,0)
Diagnóstico clínico				
Insuficiencia mitral	2 (60,0)	4 (20,0)	4 (20,0)	10 (33,4)
Estenosis mitral	0 (0,0)	4 (20,0)	7 (35,0)	11 (18,3)
Doble lesión mitral	3 (15,0)	10 (50,0)	5 (25,0)	18 (30,0)
Insuficiencia mitral e insuficiencia aórtica	5 (25,0)	1 (5,0)	0 (0,0)	6 (10,0)
Doble lesión mitral e insuficiencia aórtica	0 (0,0)	1 (5,0)	1 (5,0)	2 (3,3)
Lesión trivalvular	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (15,0)	3 (5,0)

Cuadro 2

Valvulitis reumática crónica: hallazgos histopatológicos

	Grupo 1 % (n=20)	Grupo 2 % (n=20)	Grupo 3 % (n=20)	Total % (n=20)
Tejido añadido				
Colágeno	100,0	100,0	100,0	100,0
Fibras de músculo liso	100,0	60,0	95,0	85,0
Calcificación	0,0	5,0	60,0	21,7
Neovascularización	100,0	100,0	90,0	96,7
Nódulos de Aschoff	35,0	0,0	0,0	11,7
Endocarditis	20,0	5,0	5,0	10,0

LA ANGIOGÉNESIS EN LA VALVULITIS CRÓNICA REUMÁTICA

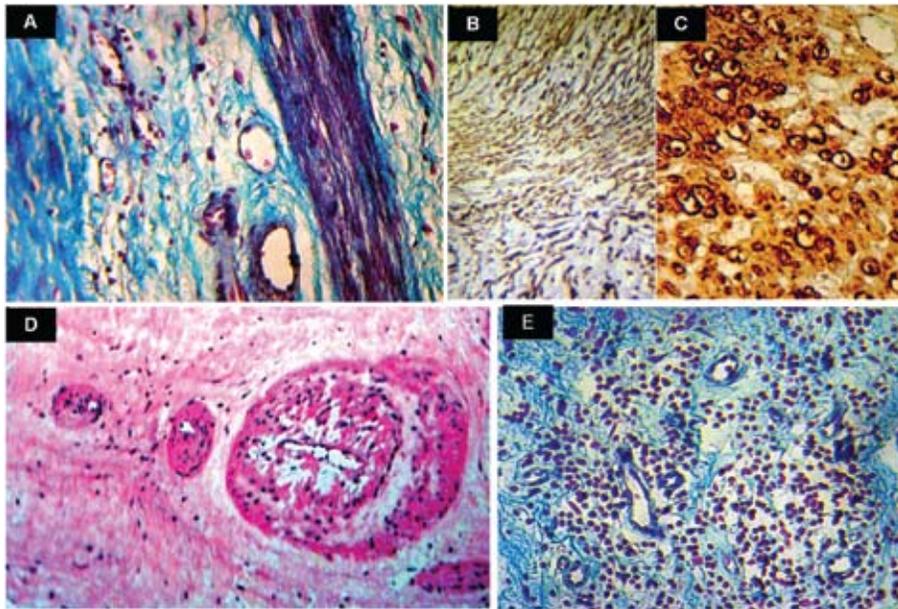


Figura 2. Microfotografías que muestran el aspecto del tejido añadido en las valvas con inflamación crónica reumática. A. Tejido colágeno, neovascularización y fibras musculares lisas. (Tricrómico de Gomori). B. Fibras musculares lisas positivas para anti actina músculo liso. C. Cortes transversales de fibras musculares lisas vacuoladas ,positivas para anti actina músculo liso. D. Neovascularización arteriolar con arteritis severa. E. Fibrosis, neovascularización e infiltrado linfomononuclear Grado 3. (Tricrómico de Gomori)

sólo se observó en los grupos 2 (5,0%) y 3 (60,0%). La endocarditis microscópica fue comprobada en el 20,0% de los casos del grupo 1 y en el 5 % de las biopsias de los otros grupos (2 y 3).

Angiogénesis o neovascularización en las valvas

La presencia de vasos sanguíneos neoformados fue un hallazgo constante en los tres grupos de edad.

Solamente en el grupo 3 hubo dos casos en los cuales no se observó neovasos La densidad total (vasos/mm²) de la angiogénesis fue decreciente desde el grupo 1 al 3; 14,78±1,92, 5,98±1,08 y 3,55±0,76, respectivamente (P<0,001. ANOVAF= 19,162). Se demostró que en fase inicial de la valvulitis crónica reumática, en las primeras dos décadas de la vida del paciente, la neovascularización es más florida y/o abundante. En el Cuadro 3, se resume la densidad de

Cuadro 3

Casos por grupo de edad y densidad de cada tipo de neovaso

Tipo de neovaso (vaso/mm ²)*	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Precursor	3,69±0,56	1,31±0,35	0,64±0,25
Madre	4,71±0,73	2,27±0,37	1,38±0,36
Con pared muscular	2,66±0,28	1,12±0,23	0,97±0,23
Con gemación	0,61±0,14	0,14±0,02	0,07±0,03
Con tabiques	1,96±0,42	0,77±0,16	0,31±0,05
Con intususcepción	0,21±0,03	0,15±0,04	0,07±0,02
Estructura glomeruloide	0,05±0,02	0,01±0,00	0,00±0,00
Hijo	0,57±0,11	0,18±0,05	0,08±0,02
Célula endotelial	0,32±0,06	0,03±0,01	0,03±0,02
Todos	14,78±1,92	5,98±1,08	3,55±0,76

* Promedio ± EE

cada tipo de neovaso en los tres grupos. La densidad de cada uno de ellos fue mayor en el grupo 1, que en los grupos 2 y 3, de pacientes de mayor edad, con una diferencia significativa. Figuras 3 y 4. En todos los casos el vaso predominante fue el “vaso madre”. Este vaso es una estructura transitoria que posteriormente evoluciona a las formas intermedias y

finalmente a las más estables (vasos hijos y vasos con pared muscular). Es importante hacer notar, que las estructuras glomeruloides y las células endoteliales aisladas fueron muy escasas en los tres grupos. Figuras 5 y 6.

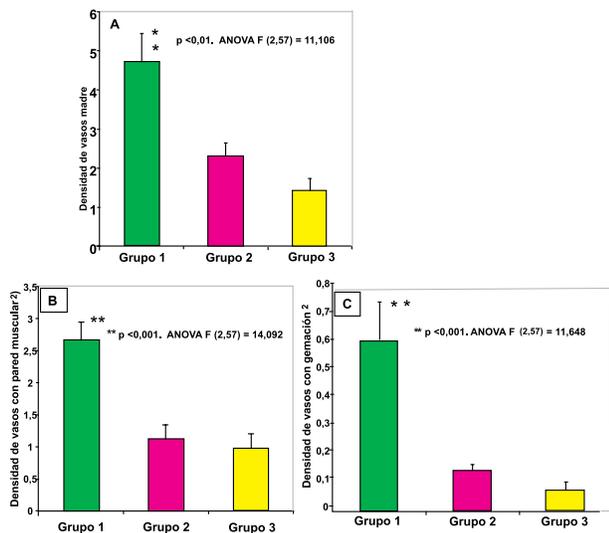


Figura 3. Casos por grupo de edad y densidad vascular: A. Vasos madres. B. Vasos con gemación.

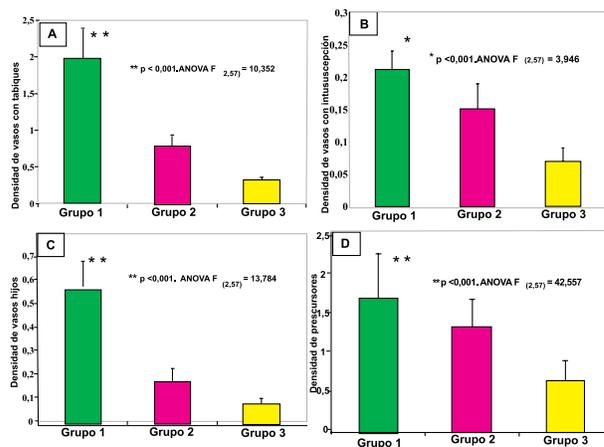


Figura 4. Casos por grupo de edad y densidad vascular: A. Vasos con tabiques. B. Vasos con intususcepción. C. Vasos hijos. D. Precusores.

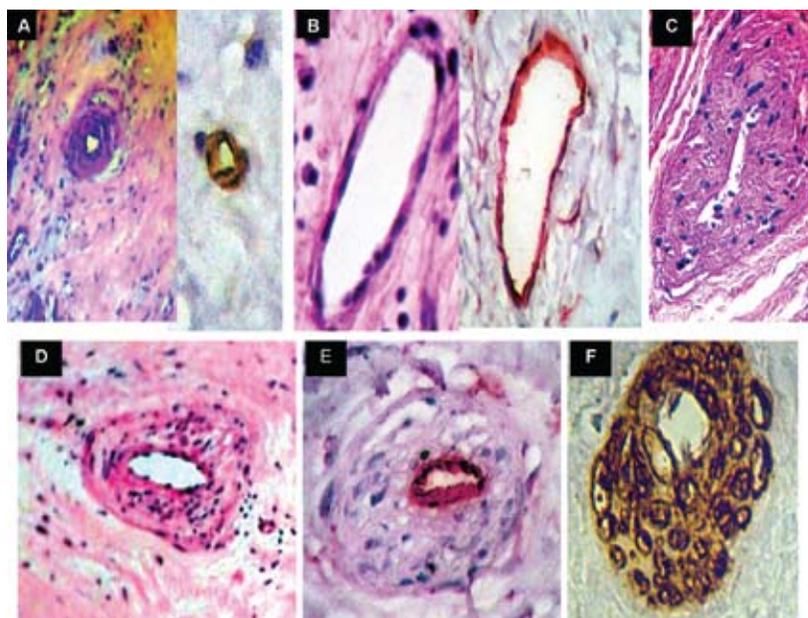


Figura 5. Microfotografías que muestran varios tipos de neovasos .A- Vaso precursor con coloración de Azul Alciano e inmunomarcaje con CD 34. B.- Vaso madre (H-E) e inmunomarcaje positivo para CD34. C Arteria muscular muy engrosada. D. Arteritis y periarteritis. E. Arteria muscular con células endoteliales positivas para CD 34. F. Arteria muscular con marcada proliferación de fibras musculares lisas parietales positivas para anti actina.

LA ANGIOGÉNESIS EN LA VALVULITIS CRÓNICA REUMÁTICA

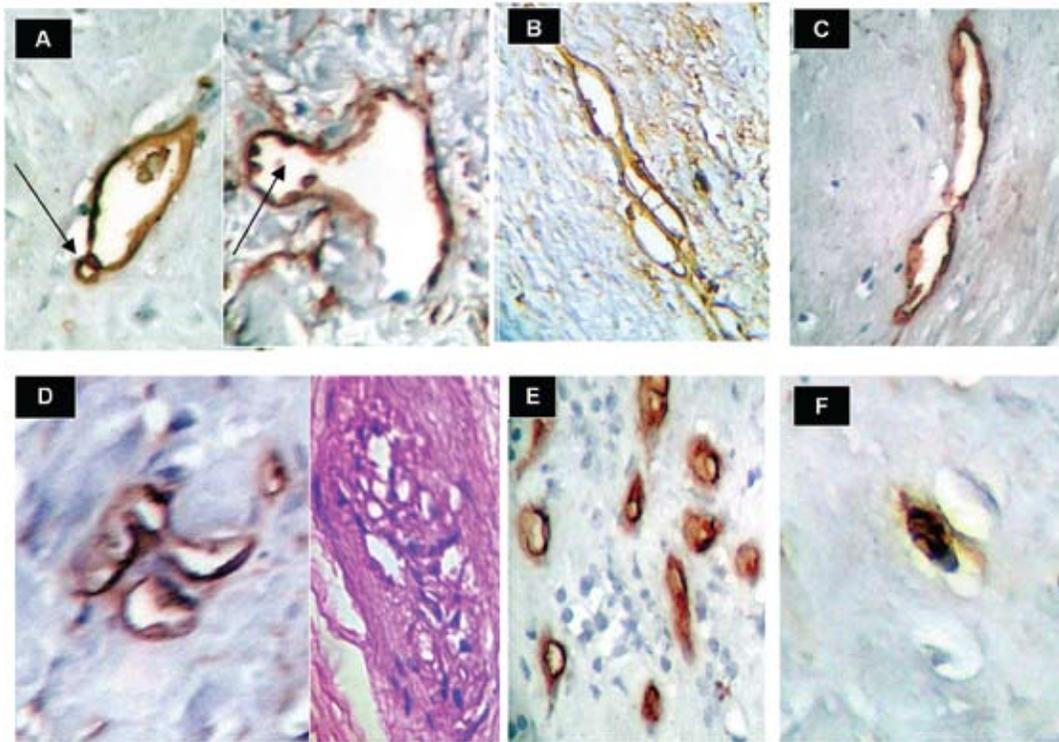


Figura 6. Microfotografías de estructuras neovasculares positivas con CD34 en la esponjosa de valvas con inflamación crónica reumática. A. Vasos con gemación (flechas). B. Vasos con tabiques. C. Vaso con intususcepción. D. Estructura glomeruloide positiva para CD34 y teñida con H-E. E. Vasos hijos. F. Célula endotelial aislada.

DISCUSIÓN

Los hallazgos clínicos y patológicos de los tres grupos de edades analizados, demostraron que existe un deterioro funcional valvular progresivo como está descrito en los estudios publicados a nivel mundial (12,13).

Los episodios recurrentes de FR y el factor hemodinámico, causan daño progresivo al tejido valvular por la remodelación colágena (fibrosis), especialmente en los bordes libres y cuerpos de las valvas, comisuras y cuerdas tendinosas de los aparatos valvulares y/o válvulas sigmoideas, con la consiguiente disfunción valvular (insuficiencia, estenosis o doble lesión). El grupo 1 formado por las biopsias de los pacientes más jóvenes (15 años o más) de la muestra estudiada, representó la fase inicial de la valvulitis crónica reumática, cuando aún la remodelación fibrosa es moderada, la inflamación y neovascularización son mayores y donde se puede observar la lesión granulomatosa típica de la enfermedad. Por el toque más leve de las valvas y otros elementos del aparato valvular mitral, hubo un

predominio de insuficiencia y doble lesión mitral.

En el grupo 2, de pacientes con edades mayores de 31 años o más, la fibrosis fue mayor, la inflamación y densidad neovascular menor que en el grupo anterior. Hubo un predominio de doble lesión mitral.

En el grupo 3, integrado por pacientes mayores de 40 años, la estenosis mitral predominó sobre la insuficiencia pura, la cual sólo se observó en los pacientes más jóvenes de este grupo. La progresión de las lesiones fue más evidente en este grupo donde se observó una mayor afección de las valvas (fibrosis y calcificación) y un mayor número de válvulas implicadas en el proceso pues fue el único grupo que presentó lesiones trivalvulares. Hacemos la observación que la insuficiencia tricúspide orgánica constituye un signo de gravedad.

Desde el punto de vista histológico, encontramos una disminución progresiva de las lesiones inflamatorias exudativas (infiltración por células inflamatorias y angiogénesis) y un aumento de la

remodelación fibrosa a medida que aumenta la edad del proceso, elementos que, en conjunto, constituyen una respuesta a la injuria valvular causada por el estreptococo la cual no está del todo esclarecida.

Disfunción endotelial en el daño de las valvas y válvulas cardíacas. La lesión del endotelio de superficie de las válvulas cardíacas es uno de los eventos iniciales en diferentes patologías valvulares. En el proceso inflamatorio producido por los anticuerpos antiestreptococos circulantes que causan una disfunción endotelial en primer lugar, intervienen una serie de factores celulares y humorales, los cuales desencadenan la cascada de eventos donde están involucradas las células endoteliales, los linfocitos T (CD4+ y CD8+), los cuales liberan IFN- γ y FNT- α , citoquinas tipo Th1, activan macrófagos y estos, a su vez, inducen una mayor disfunción endotelial, sin dejar de mencionar el papel de las células intersticiales o dendríticas de las valvas, cuyo papel como presentadoras de antígenos es importantísimo, además de secretoras de matriz extracelular (14,15). El cultivo de células intersticiales de las valvas mitrales ha demostrado que son células heterogéneas con dos fenotipos: uno con características similares a los miofibroblastos y el otro, no bien identificado que presenta características fenotípicas, inmunohistoquímicas y ultraestructurales diferentes a los miofibroblastos, a las células musculares y endoteliales (16-18).

De esta manera se forma un ciclo inflamatorio tanto en los episodios agudos como en la etapa crónica., el cual puede mantenerse y progresar con la presencia de neovasos (19,20). Por otra parte, en las valvas cardíacas inflamadas se ha detectado la presencia de una quimioquina transmembrana (SR-PSOX/CXCL16) derivada de los cojinetes del canal atrio-ventricular del embrión, en el momento de la transformación endotelial- mesenquimática, la cual interviene en la infiltración tisular de los linfocitos T CD8. activados y su adhesión a la VCAM.1, en la activación de macrófagos, la adhesión bacteriana al tejido valvular y su fagocitosis por células presentadoras de antígeno. De esta manera, en un círculo vicioso, se perpetúa el proceso inflamatorio hasta la remodelación fibrótica de las estructuras inflamadas (21,22). Se ha demostrado que la inhibición del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) disminuye, pero no inhibe, las células intersticiales. El óxido nítrico está implicado en los procesos de disfunción endotelial y en la reparación posterior al daño vascular, regulando la proliferación y migración

celular especialmente de las células intersticiales (23). Desde el punto de vista morfológico, durante toda su evolución, el tejido valvular presenta alteraciones en su estructura, especialmente en la capa esponjosa, donde se evidencia infiltrado inflamatorio, neovascularización y fibrosis (24). En la respuesta reparativa proliferativa de las valvas también intervienen las células musculares cardíacas que se agrupan en haces musculares procedentes del miocardio auricular así como las fibras musculares lisas de arteriolas y vénulas que pueden encontrarse en la base de las valvas.

Angiogénesis o neovascularización como elemento de respuesta tisular en la valvulopatía reumática. En general, los vasos sanguíneos pueden formarse por dos mecanismos básicos: la vasculogénesis y la angiogénesis o neovascularización. La vasculogénesis es un proceso asociado a la hematopoyesis, que consiste en la formación de vasos a partir de los angioblastos o precursores de células endoteliales, durante el desarrollo embrionario (25). La angiogénesis o neovascularización es el proceso de formación y diferenciación de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes, como resultado de una cascada de eventos, la cual incluye la sobreexpresión de diversos factores de crecimiento en respuesta a variados estímulos ambientales (26). El término de angiogénesis involucra el concepto de remodelación vascular y maduración como se ha comprobado en todas las biopsias de este estudio. La angiogénesis es indispensable en procesos fisiológicos como el desarrollo de tejidos y órganos, la reproducción y la reparación tisular, donde promueve procesos reguladores que estabilizan los vasos formados y detienen el proceso de crecimiento celular. La pérdida de su regulación puede conducir a la aparición o perpetuación de fenómenos tisulares patológicos bien identificados como en la artritis reumatoide, hemangiomas, psoriasis, la diabetes mellitus y el crecimiento de tumores y metástasis. Es un proceso complejo que involucra numerosas células, factores solubles y componentes de la matriz extracelular. La formación de neovasos comprende varias etapas como : la liberación de proteasas (activador del plasminógeno, metaloproteinasas) secretado por las células endoteliales activas; degradación de la membrana basal; migración de células endoteliales al intersticio (factores angiogénicos); proliferación de células endoteliales con la consiguiente formación de la luz vascular; producción de la nueva membrana basal y reclutamiento de pericitos y fusión de los vasos neoformados (27). El elemento celular más singular

en este proceso aparte de la célula endotelial, es el pericito, (célula mesenquimática diferenciada con varias funciones). Interviene en el proceso inflamatorio como la fagocitosis, y, coordina la función de la célula endotelial, regulando su proliferación y función microvascular. El pericito mantiene una relación estrecha con la célula endotelial y es capaz de sintetizar agentes vasoactivos, modular la permeabilidad capilar e incluso liberar inhibidores del crecimiento de las células endoteliales, ejerciendo influencia en la inhibición de la angiogénesis (28).

En este estudio, se observó que la angiogénesis es constante en la valvulitis reumática crónica y se acompañó siempre de tejido añadido en la válvula. Normalmente, la válvula recibe sus nutrientes y otros factores, por difusión desde la sangre, a través del endotelio de superficie. Sin embargo, durante la injuria a la válvula, ocurre el remodelado, se añade tejido y engruesa la válvula. La presencia de nuevos vasos es necesaria para proporcionar irrigación a las zonas remodeladas, más gruesas, alejadas de la superficie endocárdica, perpetuando el ciclo de inflamación-fibrosis-neovascularización. Siendo la válvula cardíaca un elemento avascular, surge la interrogante, si estos nuevos vasos son formados a partir de vasos preexistentes en la raíz de la válvula o si son formados a partir de células progenitoras circulantes o residentes en el tejido valvular. Comprobamos como ha sido descrito, que en las fases iniciales de la valvulitis reumática principalmente en las primeras dos décadas de la vida del paciente, la neovascularización presenta una mayor densidad, acompañada de edema, necrosis y mayor infiltrado inflamatorio. Su presencia en las etapas iniciales de valvulitis crónica indica que juega un rol importantísimo para mantener y alimentar el proceso de fibrosis. En las etapas más tardías, fue menos importante y casi ausente en el tejido cicatricial acelular. En las fases finales o de secuela de valvulitis crónica reumática, la angiogénesis se estabiliza y comienza a descender la densidad de los vasos en las valvas como se pudo comprobar en este trabajo. En esta etapa última de la valvulopatía reumática, el aparato valvular está completamente involucrado en el proceso cicatricial, está deformado, calcificado y con una disfunción severa.

Heterogeneidad de la neovascularización: la neovascularización o angiogénesis de las valvas con relación a las etapas de la valvulopatía estudiada, también presentó heterogeneidad y cambios cuantitativos en relación con la progresión de las lesiones. La heterogeneidad de los neovasos que

observamos en las valvas presentó las mismas características descritas por Petterson y col., en el músculo esquelético, miocardio, peritoneo, grasa perimuscular y piel de la oreja (11). La observación y cuantificación de varios tipos de neovasos en cada etapa estudiada, nos permitió penetrar en la intimidad del proceso de la neovascularización, a nivel molecular. En cada etapa de la angiogénesis intervienen diversos factores, como: las metaloproteinasas, el activador del plasminógeno y los inductores de la angiogénesis los cuales promueven la migración y proliferación de células endoteliales. Estos últimos comprenden tres grupos de factores de crecimiento y/o citoquinas: a) factores de crecimiento endotelial vascular y angiopoietinas, los cuales actúan directa y específicamente sobre las células endoteliales; b) las citoquinas, quimioquinas y enzimas angiogénicas como el bFGF; las cuales activan, no sólo a las células endoteliales, sino a un amplio grupo celular y c), los factores que actúan indirectamente, como el factor de necrosis tumoral, cuyo efecto se produce por la liberación de factores de los macrófagos y las moléculas de adhesión como las selectinas, caderinas e integrinas, las cuales intervienen en la interacción célula-célula y célula-matriz. En nuestro análisis, se evidenció que los neovasos más numerosos en todas las etapas estudiadas fueron los “vasos madres”, denominados de esta manera porque evolucionan dando lugar a otras estructuras neoformadas llamados “capilares hijos” y “cuerpos glomeruloides”, mediante su gemación, tabicación o intususcepción. Estos “vasos madres” resultan del aumento del calibre de la luz de los vasos precursores para dar origen a las demás formas vasculares y el posterior reclutamiento de pericitos y células musculares. También, son el origen de los neovasos venosos y arteriales musculares demostrados mediante inmunohistoquímica. Estos últimos serían el producto de la acción de otro factor de crecimiento derivado de la placenta (PIGF) como ha sido demostrado, el cual induce a una neovascularización más específica; es decir, a la formación de vasos grandes y estables que observamos en las fases más tardías (29-32).

Inhibidores de la angiogénesis

Existen en el organismo, inhibidores endógenos de la angiogénesis que mantienen quiescente el endotelio en el adulto. La detención de la angiogénesis en un momento dado puede deberse al incremento de estos inhibidores endógenos o al agotamiento de los reguladores positivos. Los inhibidores de

la angiogénesis actúan en diferentes momentos del proceso, bloquean la migración celular, la proliferación o la capacidad de formar capilares. Cada uno de estos procesos puede ser objetivo de intervención terapéutica y ya existen numerosos inhibidores sintéticos disponibles como los inhibidores: del remodelado de la matriz extracelular, de las moléculas de adhesión; de las células endoteliales activadas; de la angiogénesis o sus receptores e inhibidores de señales intracelulares de las células endoteliales. La mayoría de estos fármacos se encuentran en estado de experimentación *in vitro* y/o *in vivo* (33). Actualmente, además de la migración y proliferación de células vasculares, se ha dado gran importancia al papel de células progenitoras en la reparación de lesiones vasculares (34).

Conclusión: el estudio y análisis de las características clínicas y patológicas de biopsias de valvulopatía reumática crónica en diferentes etapas evolutivas y de su relación con los aspectos de la neovascularización observada y evaluada con métodos inmunohistoquímicos, nos permite concluir que la angiogénesis es constante en las fases de valvulitis crónica reumática y forma parte del cortejo de elementos tisulares inflamatorios y reparativos. Además, es importante hacer notar que la angiogénesis es mucho más florida en las etapas tempranas de la valvulitis crónica, cuando hay mayor inflamación y el remodelado fibroso de la válvula se está iniciando. Con la progresión de la enfermedad, la neovascularización y la inflamación tienden a disminuir, acompañado de un proceso importante de cicatrización en la válvula, lo cual constituye la etapa de secuela. Considerando que los vasos neoformados presentan variantes morfológicas producidas por diferentes factores moduladores, es probable que estos puedan constituirse en blanco terapéutico para inhibir la angiogénesis, disminuir así la remodelación colágena del aparato valvular mitral y evitar o disminuir su disfunción. Es importante continuar la investigación clínica y anatomopatológica de esta enfermedad para proponer una terapéutica médica alternativa en fases tempranas y retardar y/o en un futuro, evitar el reemplazo valvular.

REFERENCIAS

- Rafique Essop M, Nkomo Vuyisile T. Rheumatic and nonrheumatic valvular heart disease: Epidemiology, management, and prevention in Africa. *Circulation*. 2005;112:3584-3591.
- Suárez C, Milano M, Fernández H, Valderrama E. Evaluación de las biopsias cardiovasculares procedentes del Hospital Universitario de Caracas (1981-2000). *Avances Cardiol*. 2002;22:1-9.
- Zhi-Gang P, Xiu-nan W, Yan-wen L, Hong-Vi Z, Archard LC. Detección del HSV-1 en el tejido valvular reumático. *Chin Med J*. 2005;118:370-376.
- Flautes M, Suárez C, Álvarez A, Suárez L, Márquez AC. Valvulopatías cardíacas adquiridas. Análisis postmortem de 119 casos. *Rev Fac Med*. 1991;14:75-81.
- Estévez JA, Suárez C. Estudio morfológico y distribución de los mucopolisacáridos ácidos en valvulopatías mitrales. Análisis de 94 biopsias valvulares mitrales. *Bol Hosp Univer Caracas*. 1988;18:31-42.
- Quinn A, Kosanke S, Fischetti V, Factor S, Cinnamon M. Induction of autoimmune valvular heart disease by recombinant streptococcal M protein. *Infect Immunol*. 2001;69:4072-4078.
- Guilherme L, Kalil J. Rheumatic fever: From sore throat to autoimmune heart lesions. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004;134:56-64.
- Fraser WJ, Haffejee Z, Jankelow D, Wade A, Cooper K. Rheumatic Aschoff nodules revisited: Cytokine expression corroborates recently proposed sequential stages. *Histopathology*. 1997;31:460-464.
- Van der Bel-Kahn J, Becker AE. The surgical pathology of rheumatic and floppy mitral valves. Distinctive morphologic features upon gross examination. *Am J Surg Pathol*. 1986;10:282-292.
- Suárez BC, Díaz MV, Hamana L, Mora V. Enfermedad reumática cardiovascular: observaciones anatomopatológicas en biopsias valvulares de jóvenes menores de 20 años de edad. *Avances Cardiol*. Aceptado en mayo 26 de 2008.
- Petterson A, Nagy JA, Brown LF, Sundberg C, Morgan E, Jungles S, et al. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest*. 2000;80:99-115.
- Schoen F, Sutton M. Contemporary issues in the pathology of valvular heart disease. *Hum Pathol*. 1987;18:568-576.
- Waller B, Howard J, Fess S. Pathology of mitral valve stenosis and pure mitral regurgitation-Part II. *Clin Cardiol*. 1994;17:395-402.
- Lester W, Gotlieb A. In vitro repair of the wounded porcine mitral valve. *Circ Res*. 1988;62:833-845.
- Lester W, Rosenthal A, Granton B, Gotlieb A. Porcine mitral valve interstitial cells in culture. *Lab Inv*.

LA ANGIOGÉNESIS EN LA VALVULITIS CRÓNICA REUMÁTICA

- 1988;59:710-720.
16. Mulholland DL, Gotlieb AI. Cardiac valve interstitial cells: Regulator of valve structure and function. *Cardiovasc Pathol.* 1997;6:167-174.
 17. Zacks S, Rosenthal A, Granton B. Characterization of cobblestone mitral valve interstitial cells. *Arch Pathol Lab Med.* 1991;115:774-779.
 18. Filip D, Radu A, Simionescu M. Interstitial cells of the heart valves possess characteristics similar to smooth muscle cells. *Circ Res.* 1986;59:310-320.
 19. Roberts S, Kosanke S, Dunn S, Jankelow D, Duran C, Cunningham M. Pathogenic mechanisms in rheumatic carditis: Focus on valvular endothelium. *J Infect Dis.* 2001;183(3):507-511.
 20. Villaschi S, Nicosia R. Angiogenic role of endogenous basic fibroblast growth factor released by rat aorta after injury. *Am J Pathol.* 1993;143:181-190.
 21. Yamauchi R, Tanaka M, Kume N, Minami M, Kawamoto T, Togi K, et al. Upregulation of SR-PSOX/CXCL16 and recruitment of CD8+ T cells in cardiac valves during inflammatory valvular heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:282-287.
 22. Guilherme L, Cury P, Demarchi L, Coelho V, Abel L, Lopez A, et al. Rheumatic heart disease. Proinflammatory cytokines play a role in the progression and maintenance of valvular lesions. *Am J Pathol.* 2004;165:1583-1591.
 23. Durbin A, Nadir N, Rosenthal A, Gotlieb A. Nitric oxide promotes in vitro interstitial cell heart valve repair. *Cardiovasc Pathol.* 2005;14:12-18.
 24. Gulizia JM, Cunningham M W, McManus BM. Immunoreactivity of anti-streptococcal monoclonal antibodies to human heart valves. *J Pathol.* 1991;138:265-301.
 25. Sánchez V. Papel de la angiogénesis en el crecimiento tumoral. *Rev Cubana Invest Biomed* 2001;20(3):223-230
 26. Hamawy A, Lee L, Crystal R, Rosengarrt T. Cardiac angiogenesis and gene therapy: A strategy for myocardial revascularization. *Curr Opin Cardiol.* 1999;14:515-532.
 27. General Pathology and Immunology Department of Biomedical Sciences and Biotechnology School of Medicine, University of Brescia and Italian Association for Cancer Research. Special project angiogenesis. Italy: 2001. Available from: URL: <http://www.med.unibs.it/~airc/>
 28. Hamana L. Consideraciones sobre los pericitos como reguladores de la proliferación y función microvascular. Su papel en las enfermedades cardiovasculares. *Vitae* 2003 oct dic 17. Available from: URL: <http://caibco.ucv.ve/Vitae/VitaeDiecisiete/Portada/homevitae.htm>
 29. Nagy J, Dvorak A, Dvorak H. VEGF-A and PIGF roles in angiogenesis and arteriogenesis. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13:169-175.
 30. Zisch A, Lutolf M, Hubbell J. Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors. *Cardiovasc Pathol.* 2003;12:295-310.
 31. Sundberg C, Kowanetz M, Brown L, Detmar M, Dvorak H. Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: Phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Lab Invest.* 2002;82:387-401.
 32. Sims D. Recent advances in pericyte biology-implications for health and disease. *Can J Cardiol.* 1991;7:431-443.
 33. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: Regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001;61:253-270.
 34. Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: Implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res.* 2000;60:1388-1393.

Correspondencia:

Dra. Claudia Blandenier Bosson de Suárez

Sección de Patología Cardiovascular

Instituto Anatomopatológico” Dr. José Antonio O’Daly”

Facultad de Medicina. UCV. Caracas.

Telf. Lab. 0-212-6053492. Hab. 2577656.

E-mail: claudia1937@cantv.net