

Caracterización de la angiogénesis en la valvulitis reumática crónica como factor de progresión de las lesiones del aparato valvular mitral

Drs. María Valentina Díaz Ruiz*, Claudia B de Suárez*, Ernesto Trejo**, Leticia Hamana*

* Instituto Anatomopatológico "Dr. José Antonio O'Daly". UCV. ** Cátedra de Patología General y Fisiopatología. Escuela de Medicina Luis Razetti. UCV

RESUMEN

La caracterización de la angiogénesis en la valvulopatía crónica reumática y su relación con la progresión de las lesiones del tejido valvular es novedosa en nuestro medio. El objetivo de este estudio es cuantificar la neovascularización y relacionarla con la progresión del proceso inflamatorio y de la remodelación colágena (fibrosis). Se analizaron 40 biopsias con valvulitis crónica reumática mitral, de pacientes con edades representativas de dos etapas evolutivas. El promedio de edades en el grupo A, fue de $31 \pm 1,5$ años y $49 \pm 1,4$ años en el grupo B. Las secciones histológicas fueron coloreadas con hematoxilina-eosina y tricrómico de Gomori, e inmunomarcadas con CD34. Macroscópicamente, las valvas de ambos grupos estaban engrosadas por fibrosis. En el grupo B, las lesiones fueron más severas, siendo la calcificación focal, su nota más importante (50,0%). Histológicamente, en ambos grupos, se observó fibrosis, infiltrado inflamatorio sin presencia de nódulos de Aschoff. Los mayores grados de inflamación fueron observados en el grupo A. En el grupo B, hubo calcificaciones en el 60 % vs. 5 % de los casos del grupo A. En cada caso, se contaron los neovasos con marcaje positivo para CD34. La densidad vascular fue calculada dividiendo el número total de vasos entre el área de la sección en mm^2 (vasos/ mm^2). La densidad fue de $5,98 \pm 1,08$ vasos/ mm^2 , y $3,55 \pm 0,76$ ($P < 0,001$) vasos/ mm^2 en el grupo A, y en el grupo B, respectivamente. Se concluyó que la angiogénesis es constante en todas las fases de la valvulitis crónica reumática y que forma parte del cortejo de los elementos tisulares inflamatorios y reparativos, representando un potencial factor de progresión y de agravamiento de la remodelación colágena. Considerando que la angiogénesis presenta variantes morfológicas producidas por diferentes factores moduladores, es probable que estos puedan constituirse en blancos terapéuticos para inhibir este proceso y disminuir la cicatrización del aparato valvular mitral.

Palabras clave: Angiogénesis. Valvulitis crónica reumática. Remodelación

SUMMARY

Characterisation of angiogenesis in chronic rheumatic valvulopathy and his relation with progression of the valvular injuries is novel in our country. The objective of this study is to quantify neovascularization and to relate it with progression of the inflammatory process and fibrosis. We analyzed 40 biopsies with chronic valvulitis rheumatic from patients with representative ages of two evolutionary stages. The average of ages in the Group A, was of 31 ± 1.5 years and in Group B, of $49,7 \pm 1,4$ years. The histology sections were collored with haematoxylin-eosin and tricromic of Gomori, and immune marked with CD34. Macroscopic valves of both groups was thickened by fibrosis, although in group B, the changes were more severe being focal calcification, its more important note (50.0%). Histology cally in both groups, they were observed fibrosis, inflammatory infiltrate without presence of Aschoff.' nodules. The greater degrees of inflammation were observed in group A. The group B there were calcifications in 60 % of the cases versus 5 % of group A. In each case the positive immune neovessels were counted. The vascular density was calculated dividing the total number of vessels by the section's area (vessels/ mm^2). The density was 5.98 ± 1.08 vessels/ mm^2 , and 3.55 ± 0.76 ($P < 0.001$) in the groups A, and B, respectively. We conclude that angiogenesis is constant in all phases of the chronic rheumatic valvulitis and comprises all the courtship of the inflammatory and reparative tissue elements, representing a potential factor of progression of collagen remodeling. Considering that angiogenesis displays morphologic variants produced by different modulators factors, it is probable that they may become therapeutics targets to inhibit this process in order to diminish cicatrization of the mitral valvular apparatus.

Key words: Angiogenesis. Chronic rheumatic valvulopathy. Remodelation.

INTRODUCCIÓN

La fiebre reumática (FR) se define como una complicación tardía, no supurativa, de infecciones de la garganta producidas por el estreptococo beta-hemolítico del grupo A (EBHA), en individuos predispuestos. Igualmente se considera como una enfermedad inflamatoria sistémica y como una colagenopatía auto inmune, inducida por algunos componentes del *Streptococcus B-hemolítico* del grupo A. Aunque su incidencia ha bajado en las últimas décadas en los países en desarrollo, sigue siendo un importante problema de salud pública en Venezuela (1,2).

Esta enfermedad es causa importante de valvulopatía, siendo comúnmente afectado el aparato valvular mitral, ocasionando estenosis, insuficiencia o doble lesión acompañada o no de la afectación de las válvulas aórticas, con severa repercusión funcional que amerita el reemplazo valvular (3,4).

La enfermedad valvular evoluciona desde lesiones iniciales mínimas de la valvulitis reumática aguda o verrugosa, pasando por una etapa de remodelación fibrosa con inflamación (valvulitis crónica) hasta llegar a la fase final y de transición de la misma, y posteriormente a la fase de secuela, constituida casi exclusivamente por tejido colágeno denso (5).

Durante toda su evolución, el tejido valvular presenta alteraciones en su estructura, especialmente en la matriz extracelular de la capa esponjosa de la valva, donde se evidencia infiltrado inflamatorio, fibrosis, aumento de mucopolisacáridos ácidos y neovascularización o angiogénesis, propios del tejido de reparación o granulación, siendo variable el grado de estas alteraciones en cada etapa de su evolución (6,7).

Está demostrado que en las lesiones valvulares producidas por la fiebre reumática, se han identificado linfocitos T CD4+ y CD8+ adheridos al endotelio valvular superficial e inmediatamente por debajo del mismo, fenómeno importante en la patogénesis de la enfermedad reumática (8).

La angiogénesis o neovascularización también se ha visto acompañada de extravasación de linfocitos hacia el tejido cicatricial circundante. El hecho de que la valva cardíaca sea avascular, subraya la importancia de que la extravasación de linfocitos se realiza en los neovasos. De allí que la angiogénesis o neovascularización se considera como un factor tisular que contribuye de forma importante a la

perpetuación de los fenómenos inflamatorios, y principalmente, a la remodelación colágena (fibrosis) de los elementos anatómicos de los aparatos valvulares mitral y tricúspide, eventualmente, de las válvulas sigmoideas (válvulas aórticas y más raramente, de las pulmonares).

Por estas razones, es importante el estudio de la angiogénesis en las valvas mitrales reumáticas, su caracterización y relación con la progresión de las lesiones del tejido valvular, durante las diferentes fases de la etapa crónica de la enfermedad.

Nos planteamos la siguiente hipótesis: si la neovascularización o angiogénesis, aparece en etapas tempranas de la valvulopatía reumática y permanece con alta densidad en las valvas con escasa remodelación fibrosa, entonces esperamos encontrar una disminución progresiva de los vasos neoformados en las etapas de remodelación fibrosa y de secuela reumática.

Esta evidencia morfológica podría ser indicadora de que la angiogénesis contribuye al proceso de remodelación fibrosa de las valvas y eventualmente, los inhibidores de la angiogénesis podrían en un momento dado, disminuir o evitar la progresión de las lesiones inflamatorias y el remodelado colágeno, los cuales son en definitiva, la causa de la disfunción valvular. La disminución de la fibrosis en las estructuras del aparato valvular mitral redundaría en beneficio de su función valvular.

El principal objetivo de este estudio es cuantificar y comparar la neovascularización (densidad vascular de las valvas) de las valvas mitrales en dos fases de la valvulitis crónica y analizar sus variaciones en relación con la progresión del proceso inflamatorio y de remodelación del colágeno (fibrosis).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 40 biopsias de aparatos valvulares mitrales con valvulitis crónica reumática diagnosticadas en la Sección de Patología Cardiovascular del Instituto Anatomopatológico "José A. O'Daly". Los casos fueron seleccionados del total de biopsias diagnosticadas en el período de 1986 a 2004. Las biopsias pertenecían a pacientes operados para reemplazo valvular, en el Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Universitario de Caracas por presentar disfunción valvular severa mitral, mitro-aórtica y mitro-aórtica-tricuspídea (insuficiencia, estenosis o doble lesión).

Para la selección del material, se escogieron las biopsias más representativas de la fase final y de la fase de transición o de secuela de la valvulitis crónica reumática con o sin lesión aórtica o tricuspídea concomitante. Se consideró que la edad de los pacientes era la variable más importante para seleccionar los grupos que caracterizaban las lesiones propias de cada fase de la etapa crónica. De tal manera que se escogieron para integrar el grupo A (fase final de la valvulitis crónica reumática) los casos con edades entre 21 y 40 años de edad y para el grupo B (etapa de transición o de secuela de valvulitis crónica), las biopsias de pacientes mayores de 40 años de edad.

Variables incluidas

Datos clínicos: edad, género y diagnóstico clínico (insuficiencia, estenosis, doble lesión mitral y/o tricuspídea; estenosis e insuficiencia aórtica).

Estudio macroscópico: tipo de muestra recibida, elementos anatómicos (valvas, cuerdas tendinosas, músculos papilares, orificio valvular), etapa evolutiva de la enfermedad.

Estudio microscópico: presencia de tejido añadido, grado de inflamación y eventualmente presencia de granuloma de Aschoff, grado de fibrosis y cuantificación de la neovascularización (densidad de la neovascularización).

Técnicas para el estudio histopatológico de las biopsias.

Las biopsias fueron procesadas, según las técnicas habituales de inclusión en parafina y las secciones histológicas teñidas con las coloraciones de hematoxilina-eosina y tricrómico de Gomori, para identificar las fibras colágenas y musculares lisas.

Estudio inmunohistoquímico:

El estudio inmunohistoquímico se realizó en la Sección de inmunohistoquímica del mismo instituto, con la técnica del polímero de dextrano conjugado al anticuerpo secundario y marcado con peroxidasa (sistema EnVision) y el cromógeno diaminobencidina para investigar en los casos seleccionados su reactividad a los anticuerpos primarios monoclonales de ratón CD34 (QBEnd 10; Dako; 1:50). La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada mediante la incubación de los cortes histológicos con solución de peróxido de hidrógeno al 3 % en metanol. La recuperación antigénica se efectuó por calor con una vaporera, durante 30 minutos, en solución de buffer citrato de pH 6.0, con fase previa de calentamiento de la solución recuperadora durante 20 minutos.

Posterior al lavado con solución de *tris buffer* salino con *tween* 20 (TBST), los anticuerpos primarios fueron incubados sobre las secciones histológicas a temperatura ambiente durante una hora, seguidos de lavado con TBST. Utilizando el sistema de detección y amplificación "EnVision" de Dako, se aplicó el anticuerpo secundario polivalente (anti-anticuerpo primario de ratón y de conejo), conjugado a un polímero de dextrano marcado con peroxidasa de rábano, durante 20 minutos. Luego de lavado con TBST, se aplicó la solución de peróxido de hidrógeno y 3,3'-diaminobencidina (sistema DynaChrome; ThermoShandon) durante 10 minutos, seguido de lavado con agua corriente. Finalmente, los preparados histológicos fueron contrastados con hematoxilina de Mayer.

Se utilizaron, como controles positivos, secciones histológicas de un tumor del estroma gastrointestinal (GIST) (CD34) con reactividad conocida para los respectivos anticuerpos primarios, en tanto que la omisión de los anticuerpos primarios sobre los mismos cortes, sirvió como fuente de controles negativos.

Criterios para la cuantificación de las variables histológicas

Para la evaluación del infiltrado inflamatorio y de la fibrosis, se utilizó una graduación numérica: 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. De forma similar para la extensión de la fibrosis presente en el tejido valvar, se utilizó: grado 1 (fibrosis leve en el borde libre únicamente), grado 2 (fibrosis en el borde libre y cuerpo de la valva) y grado 3 (fibrosis en todo el fragmento).

Procedimientos

El procedimiento para el estudio histopatológico al microscopio óptico se hizo en tres tiempos: primero, se examinaron retrospectivamente, las láminas de cada biopsia con secciones histológicas del tejido valvular teñidas con hematoxilina-eosina para escoger la lámina que contenía las secciones histológicas más representativas (con tejido mejor conservado y mayor cantidad de neovasos) con el fin de evaluar en todas ellas, el grado de infiltrado inflamatorio. En un segundo tiempo, las secciones histológicas fueron estudiadas con la tinción de tricrómico de Gomori

para graduar la extensión de la fibrosis y en un tercer tiempo, determinar la densidad de la angiogénesis en los mismos cortes histológicos inmunomarcados con CD34.

Estudio de la angiogénesis. Metodología de su cuantificación

En la actualidad, la investigación en el área de la angiogénesis ha tenido un gran auge y un progreso importante al establecerse los parámetros cuantificables directamente, permitiendo el cálculo de la densidad vascular en los tejidos. Esto ha sido posible con el uso de ciertos inmunomarcadores para células endoteliales como el factor de von Willebrand, CD31 y CD34, los cuales se han correlacionado con el comportamiento y pronóstico en diferentes neoplasias. Ha sido determinado en el cáncer de próstata, glándula mamaria, ovario y tiroides, pero no se ha conocido su determinación en la valvulopatía reumática (9,10).

Cálculo de la densidad de la angiogénesis

En las láminas seleccionadas, se examinaron con objetivo de 20x, las secciones histológicas de tejido valvar, teñida con hematoxilina-eosina. Seguidamente se calculó el área de las secciones histológicas utilizando el método de conteo de cuadros ("box counting") para lo cual se utilizó papel milimetrado. Las secciones histológicas escogidas e inmunomarcadas con CD34, fueron examinadas en su totalidad, minuciosamente, a un aumento de 400x (ocular 10x, objetivo 40x). Se contaron todos los neovasos con marcaje positivo para las células endoteliales.

La densidad vascular fue calculada dividiendo el número total de vasos entre el área de la sección en mm², y fue expresada como "vasos por mm²" (vasos/mm²).

Tratamiento estadístico

Los datos obtenidos en la investigación fueron tabulados y analizados según los objetivos planteados. Se estudiaron variables cuantitativas como edad, densidad vascular, grado de inflamación y grado de fibrosis; y 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. Utilizamos la prueba de ANOVA para comparar dos grupos diferentes según diversas

variables cuantitativas (densidad vascular, grado de fibrosis, grado de inflamación). El Chi cuadrado fue usado para relacionar variables cualitativas en tablas de contingencia. La "t" de Student permitió realizar comparaciones entre dos grupos, en relación con las diferentes variables cuantitativas estudiadas. Además, se utilizó la media, desviación estándar y porcentaje para la realización de representaciones gráficas.

RESULTADOS

Resultados generales y clínicos

El promedio de edades en el grupo A, fue de 31±1,5 años de edad y en el grupo B, de 49,7±1,4 años de edad (P<0,01, t= 8.72).

Los diagnósticos clínicos relacionados con la disfunción valvular que ameritó el reemplazo valvular en los dos grupos, están consignados en la Figura 1.

En el grupo A, hubo un franco predominio de pacientes que presentaban doble lesión mitral (50,0 %) acompañada de insuficiencia aórtica en el 5,0 %. La insuficiencia mitral pura solo se observó en cuatro pacientes jóvenes de 20 a 26 años de edad, de los cuales había un solo caso con insuficiencia mitro-aórtica. Los cuatro pacientes que presentaron estenosis mitral pura eran mayores de 36 años de edad (Figura 2).

En el grupo B, el predominio de la disfunción mitral fue la estenosis (35,0 %) seguida de doble lesión mitral (30,0 %), dos de los cuales, presentaron también insuficiencia aórtica. De esta manera comprobamos que los pacientes con severa disfunción (estenosis o doble lesión mitral) constituyeron el 65,0 % de la muestra. Cuatro pacientes de 40 o más años de edad, presentaron insuficiencia mitral; a tres de los cuales, se les reseco sólo la valva antero-medial y a uno, ambas valvas. A tres pacientes les fue reemplazados los dos aparatos auriculo-ventriculares (mitral, y tricuspideo) y las tres válvulas aórticas.

Hallazgos macroscópicos

Los diversos tipos de muestras del aparato valvular mitral recibido en el laboratorio fueron variables según el procedimiento quirúrgico realizado. Los aspectos macroscópicos más importantes están consignados en las Figuras 2 y 3.

En el grupo A, el 75,0 % de las biopsias, estaba constituido por el aparato valvular mitral completo o incompleto; por la valva antero-medial (n = 3) y por ambas valvas (n = 2).

Las muestras del grupo B, estuvieron distribuidas en forma similar a las del grupo A, por el aparato valvular mitral completo o incompleto (65,0 %) y/o fragmentado, por la valva antero medial o por ambas valvas.

Descripción de las valvas

En el grupo A, prácticamente todas las valvas estaban engrosadas por fibrosis, excepto un solo caso que presentó una valva flexible, traslúcida, engrosada sólo en los bordes libre y de cierre. Igualmente, en los casos con insuficiencia mitral, la fibrosis era más pronunciada en el borde libre y de cierre. La característica más importante de las valvas fue su rigidez y en algunas su retracción ánteroposterior. El diámetro transversal del orificio mitral de 8 aparatos valvulares completos, midió entre 1,5 y 2,8 cm (2,2 cm de promedio). En el 30,0 % de los casos, se observaron nódulos calcificados localizados en su

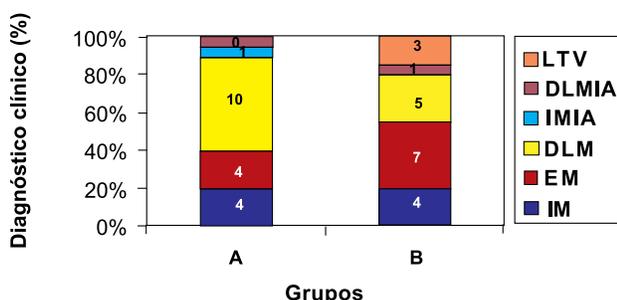


Figura 1. Distribución porcentual en los grupos A (fase final de la valvulítis crónica reumática) y B (etapa de transición o de secuela de valvulítis crónica) de acuerdo al diagnóstico clínico :IM (insuficiencia mitral) ;DLMIA (Doble lesión mitral e insuficiencia aórtica); DLM (Doble lesión mitral); EM (Estenosis mitral); IM (Insuficiencia mitral); IMIA (Insuficiencia mitral e insuficiencia aórtica); LTV (Lesión trivalvular)

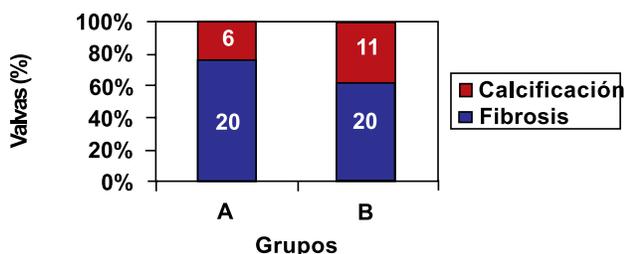


Figura 2 . Distribución porcentual en los grupos A (fase final de la valvulítis crónica reumática) y B (etapa de transición o de secuela de valvulítis crónica) de las características macroscópicas de las valvas.

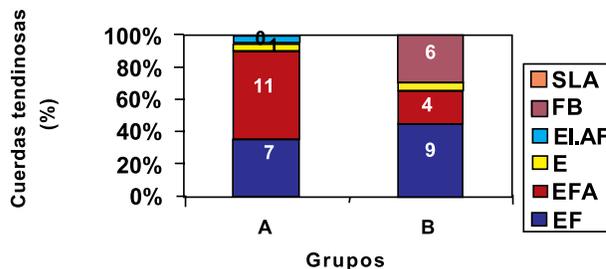


Figura 3 .Distribución porcentual en los grupos A (fase final de la valvulítis crónica reumática) y B (etapa de transición o de secuela de valvulítis crónica) de las características macroscópicas de las cuerdas tendinosas. E (engrosadas); EF (engrosadas y fibrosadas); EFA (engrosadas, fusionadas y acortadas); EI.AF (elongadas, adelgazadas y fusionadas); FB (fusionadas en bloque); SLA (sin lesión aparente).

mayoría en una las dos comisuras con extensión al tejido vecino. A un paciente, se le había practicado una comisurotomía anterior En un caso, las valvas eran flexibles con pequeños nódulos calcificados en borde libre, lesión que fue interpretada como de pos-endocarditis infecciosa. En otro caso, la valva anteromedial presentó una secuela de endocarditis infecciosa caracterizada por la pérdida de tejido y perforación del cuerpo valvar (Figura 4).

En el grupo B, las valvas presentaron cambios más severos que las del grupo anterior. Las valvas estaban uniformemente engrosadas, eran rígidas, algunas retraídas excepto dos muestras que presentaron valvas flexibles, solo engrosadas en los bordes libres y de cierre. Las comisuras estaban fusionadas en la mayoría de los casos y el orificio valvular disminuido. (El promedio de las medidas de 10 casos fue de 1,7 cm). La calcificación focal fue la nota más importante en este grupo (55,0 %). Se observaron nódulos calcificados, en el propio cuerpo de la valva (4 casos); un caso en los bordes libres; 5 casos a nivel de las comisuras de los cuales, uno operado anteriormente, era de superficie extensa y erosionada (Figura 5).

Descripción del aparato subvalvular

En ambos grupos, la mayoría de las cuerdas tendinosas (98,0 %), estaban engrosadas y fusionadas. Un solo caso del grupo A, presentó cuerdas tendinosas de aspecto macroscópico aparentemente normal. En cinco casos de ambos grupos se observó deformidad en túnel, debido a fusión de todas las cuerdas tendinosas por fibrosis. En estas piezas los dos orificios midieron: el superior de 2,4 cm en diámetro mayor (extremos: 2-2,8) y el inferior de 1,1 cm. (extremos: 1,1-1,3) en el grupo A, y 2,3 cm. (extremos: 3-1,1) y 1,2 cm

(extremos 2-1) en el grupo B. En los dos grupos, varios pacientes presentaron toque de las válvulas aórticas por el proceso inflamatorio reumático.

Hallazgos microscópicos en las valvas (microscopio de luz)

El estudio histológico de ambos grupos, mostró tejido añadido en las valvas de todos los casos, formado por tejido colágeno, infiltrado inflamatorio predominantemente linfomononuclear sin presencia

de granulomas o nódulos de Aschoff, y fibras musculares lisas (Figura 6). En ambos grupos predominó el grado 1 de inflamación (81,6 %). Los mayores grados de inflamación fueron observados en el grupo A (Figura 7a). La fibrosis estuvo presente en todos los casos. En los pacientes entre 21 y 40 años predominó la fibrosis de grado 3 (80 %) y en los pacientes mayores, este grado fue exclusivo. Ningún caso de ambos grupos presentó fibrosis leve

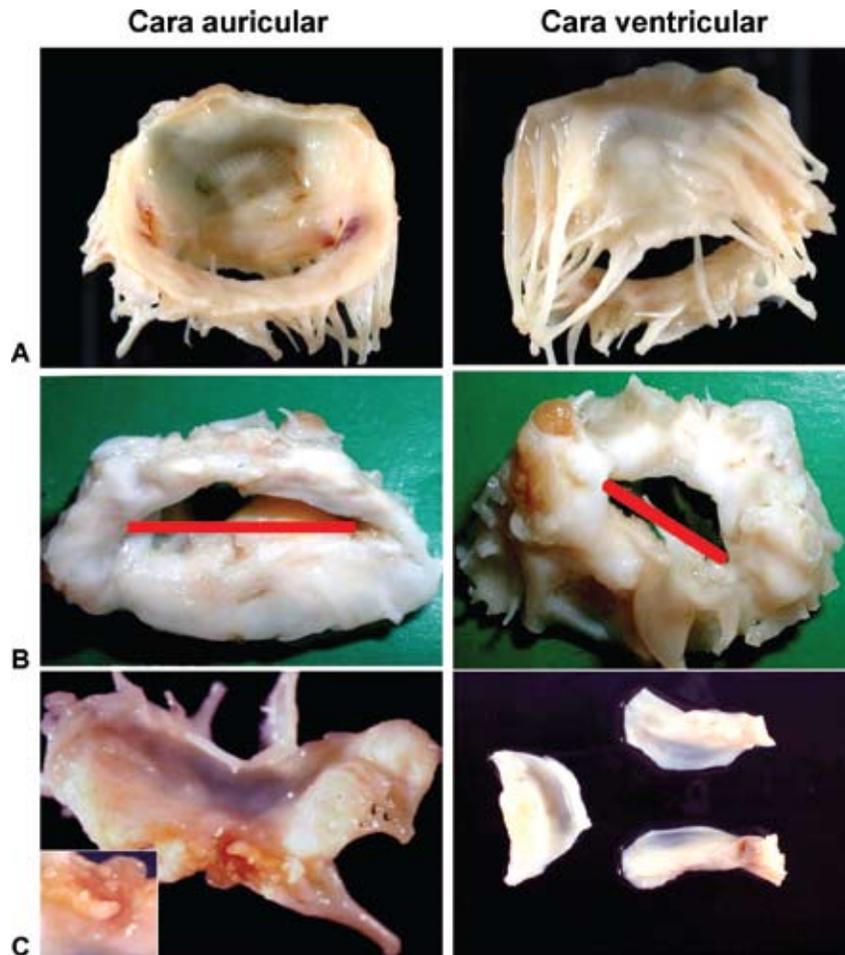


Figura 4. Fotografías de las biopsias del grupo A que representan las lesiones de la valvulitis crónica reumática en fase final. A. Aparato valvular mitral de un paciente de 31 años con doble lesión mitral. Las valvas están fibrosadas, especialmente en el borde libre y de cierre. Ambas comisuras están fusionadas. En la cara ventricular, se aprecian algunas cuerdas tendinosas engrosadas y fusionadas. B. Aparato valvular mitral de un paciente con antecedente de comisurotomía por estenosis mitral. Deformidad extrema en “túnel.” Se aprecia una diferencia importante entre el diámetro mayor del orificio valvular superior (2,4 scm) y el inferior (1,1 cm). C. Valva anteromedial resecada por insuficiencia valvular mitral con valvulitis crónica reumática complicada con calcificaciones y y focos de endocarditis en borde libre. En el recuadro, detalles de la endocarditis infecciosa.

Válvulas aórticas de un caso con DLM e insuficiencia aórtica. Las válvulas están engrosadas, especialmente en el borde libre por lesión de chorro.

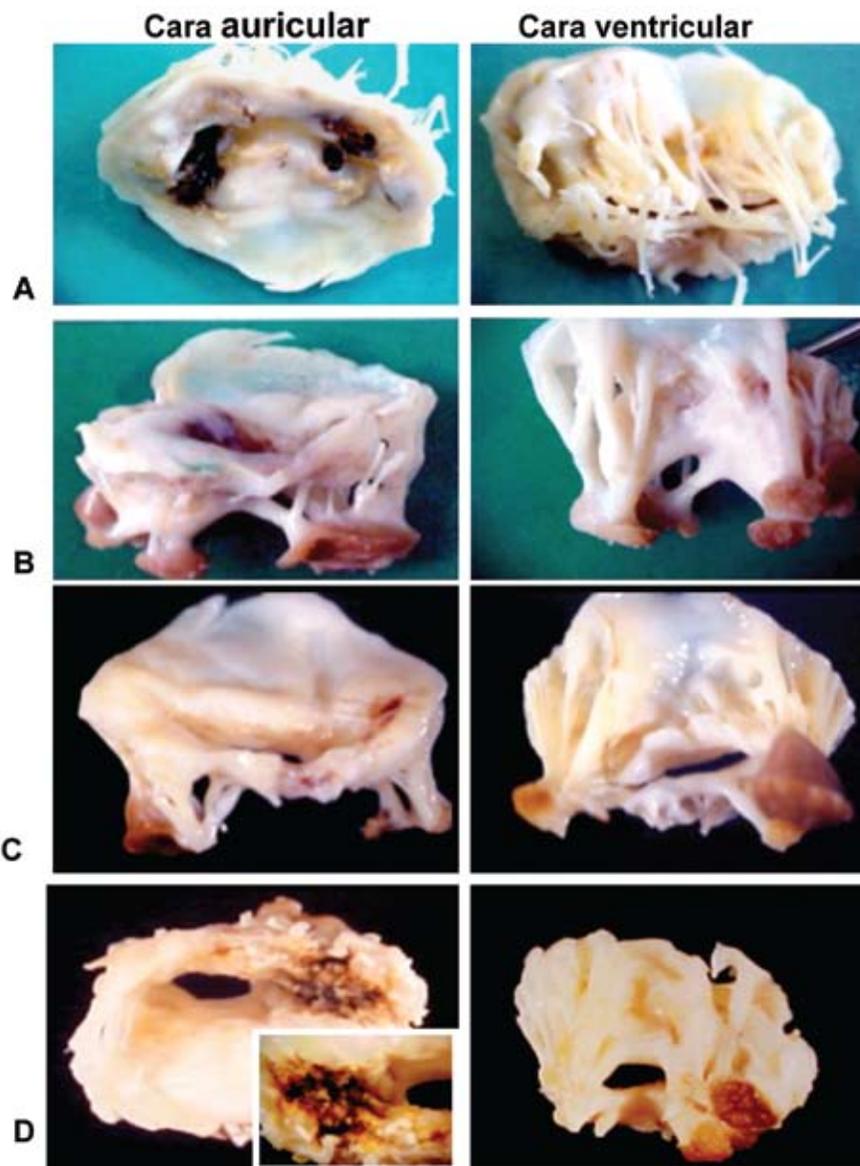


Figura 5. Fotografías de biopsias del grupo B, las cuales presentan lesiones macroscópicas características de la valvulitis reumática en fase de transición o de secuela.

A. Cara auricular del aparato valvular mitral, la cual muestra deformidad del orificio mitral con fibrosis y calcificación de comisuras. En cara ventricular, se observa orificio mitral casi ausente en forma de boca de pescado. Las cuerdas están elongadas, fusionadas y engrosadas

B. Biopsia de una paciente con doble lesión mitral. Aparato valvular mitral con deformidad en túnel. Todas las cuerdas tendinosas están fusionadas en bloque con notable acortamiento.

C. Aparato valvular mitral completo con deformidad del orificio mitral en “boca de pescado y fusión completa de los elementos del aparato subvalvular mitral. Orificio inferior en cara ventricular, disminuido de su diámetro en relación al superior.

D. Deformidad en “túnel” del aparato valvular mitral de un paciente con estenosis mitral. Se aprecia en la cara auricular a nivel de una comisura con extensión al tejido vecino, una zona con focos de calcificación erosionados con hemorragia focal. En el recuadro, detalles de la lesión calcificada. En la cara ventricular, fusión en bloque de las cuerdas tendinosas, acortamiento importante de las mismas y orificio inferior muy disminuido de diámetro.

CARACTERIZACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS EN LA VALVULITIS REUMÁTICA CRÓNICA

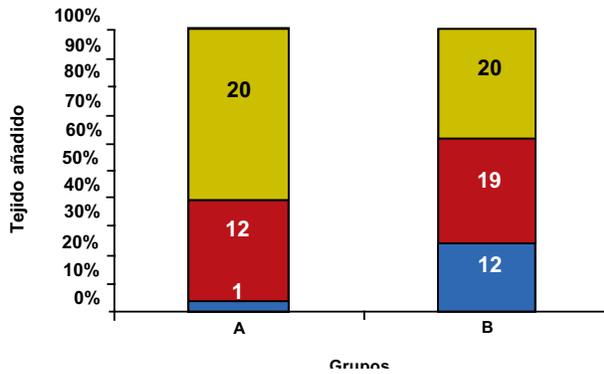


Figura 6. Distribución de los hallazgos histopatológicos relacionados con el tejido añadido. Cada barra representa la distribución de estas lesiones en los grupos en estudio A (fase final de la valvulitis crónica reumática) y B (etapa de transición o secuela de valvulitis crónica). Col (colágeno); FML (Fibras de músculo liso); Cal (Calcificación)

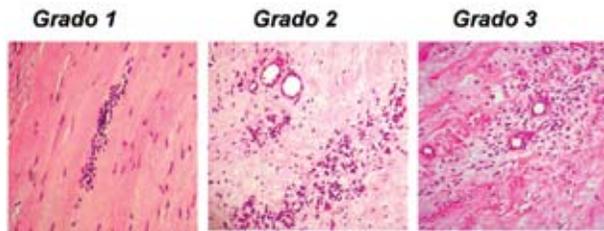


Figura 7a. Microfotografías que muestran la fibrosis de la válvula, y los diferentes grados de infiltrado inflamatorio conjuntamente con la neovascularización. Hematoxilina-eosina.

(grado 1). Hubo una diferencia entre ambos grupos en relación con la presencia de focos de calcificación microscópica. En el grupo B se observaron calcificaciones en el 60 % de los casos vs. 5 % del grupo A. (Figura 7b).

La lipoidosis o presencia de acúmulos de células adiposas maduras en el tejido valvar fue un hallazgo raro, encontrado en un caso de cada grupo.

Angiogénesis o neovascularización de las valvas

La presencia de vasos sanguíneos neoformados y de células endoteliales aisladas inmunomarcadas con CD34, fue un hallazgo constante en las valvas, excepto en dos casos del grupo B. Figura 9. La correlación entre los grupos evolutivos de la valvulitis reumática y la angiogénesis, demostró que la densidad de la neovascularización fue decreciente desde el grupo A al B. En el grupo A, la densidad fue de $5,98 \pm 1,08$ vasos/ mm^2 y en el grupo B, de $3,55 \pm 0,76$ vasos/ mm^2 y fue significativamente menor ($P < 0,01$. $t =$

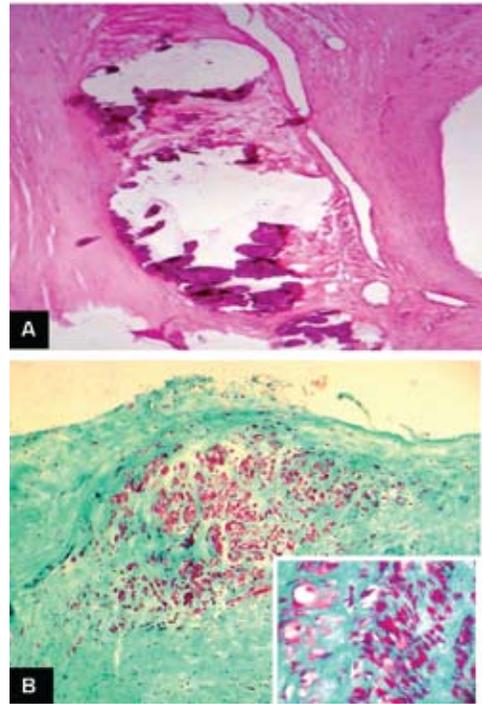


Figura 7b. A. Microfotografía de tejido de una válvula fibrosada con un foco de calcificación. ColH & E. B. Fibrosis de la válvula con proliferación de fibras musculares lisas. 200X. En el recuadro, fibras musculares lisas con atrofia y degeneración hidrópica. Tric. Gomori. 200X Y 400X.

7,93) y aún más que en los casos de la fase inicial de la valvulitis crónica ($14,78 \pm 1,92$), previamente reportados por nosotros (11). Figura 9.

DISCUSIÓN

Mundialmente se han publicado numerosos estudios, en referencia a la valvulopatía reumática, su morfología e histopatología. La respuesta del tejido que conforma la válvula ante los ataques recurrentes de fiebre reumática, es como todo proceso inflamatorio: primeramente vascular (edema, neovascularización con permeación capilar, venular y arterial) y luego, celular (infiltrado inflamatorio mononuclear), propia de la inflamación tisular. Posteriormente, sobreviene el proceso de cicatrización o curación (fibrosis) y eventualmente, calcificación distrófica (12). Dentro de los fenómenos vasculares, la neovascularización o angiogénesis ocupa un primer lugar dentro del proceso inflamatorio y es objeto de este estudio. Es

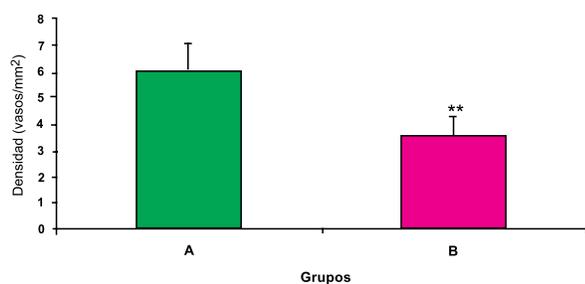


Figura 8. Comparación de la densidad promedio entre los grupos A (fase final de la valvulitis crónica reumática) y B (etapa de transición o se secuela de valvulitis crónica). Cada barra representa el promedio ES de un N = 20 para el grupo A y N=18 para el grupo B. ** P < 0,01. t = 7,93

de hacer notar que la angiogénesis ha sido encontrada no sólo en las valvas reumáticas, sino en valvas con calcificación e incluso con osificación heterotópica como forma de reparación tisular.

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 que desencadenan la cascada de eventos donde están involucradas las células endoteliales, las células inflamatorias de tipo linfocitos T (CD4 y CD8), las cuales activan macrófagos quienes a su vez inducen a una mayor disfunción endotelial, sin dejar de mencionar el papel de las células intersticiales o dendríticas como presentadoras de antígenos, importantísimo en este mecanismo inflamatorio, cerrando de esta manera el ciclo inflamatorio, el cual puede a su vez progresar con la presencia de neovasos como lo hemos expuesto anteriormente (13).

Los hallazgos clínico-patológicos de los dos grupos etarios estudiados, demostraron que existe un deterioro funcional valvular progresivo y crónico, causado por el agravamiento progresivo de la remodelación fibrosa de las valvas y cuerdas tendinosas, tal como está comprobado en los estudios reportados a nivel mundial (14,15).

Pudimos evidenciar desde el punto de vista clínico-patológico, la existencia de lesiones progresivas a medida que los pacientes eran de mayor edad. En pacientes adolescentes, de las dos primeras décadas de la vida, en las etapas más tempranas de la remodelación colágena valvular, existe un predominio de insuficiencia mitral pura como lo reportamos en un trabajo anterior (11).

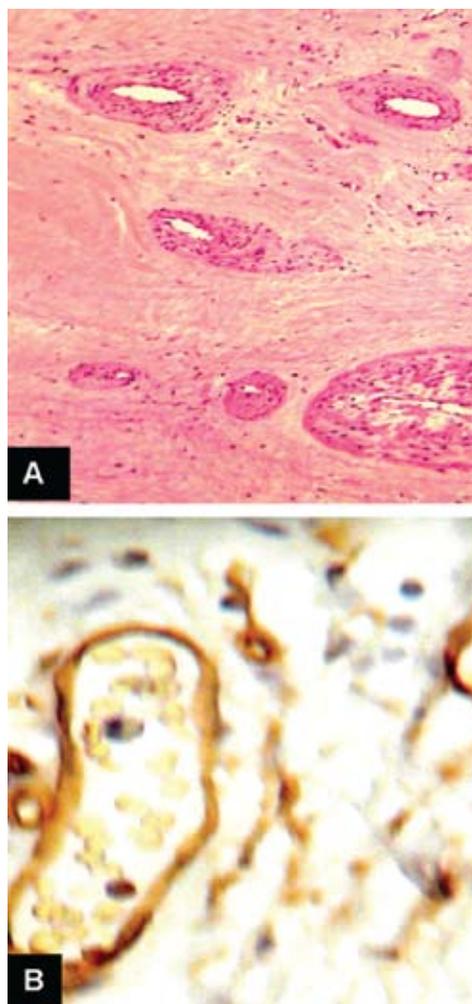


Figura 9. A. Microfotografía que muestra la neovascularización densa en la pars esponjosa de la valva. Col H & E. 200X. B. Microfotografía de neovasos inmunomarcados con CD34 para células endoteliales. 400X

En el grupo A, que representa casos con edades mayores de 21 años, se pudo demostrar que hubo un predominio de doble lesión mitral, es decir, insuficiencia mitral con el componente estenótico en casi todos los casos.

En el grupo B, que estuvo integrado por pacientes mayores de 31 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 comprobó una mayor afección de las valvas (mayor rigidez y presencia de focos de calcificación)

y hasta un mayor número de válvulas implicadas en el proceso. Es el único grupo que presentó lesiones trivalvulares, haciendo la observación que la insuficiencia tricuspídea orgánica constituye un signo de gravedad.

Por las razones expuestas, el procedimiento quirúrgico varió de acuerdo al grupo etario. Generalmente observamos resección de valvas antero-medial y posterolateral en los pacientes más jóvenes con insuficiencia y resección en bloque del aparato valvular mitral completo o incompleto en los dos grupos mayores de 30 años con estenosis mitral, aparatos con deformidad en túnel que fueron la forma anatómica más grave observada.

Desde el punto de vista histológico, hubo una relación semejante entre las lesiones inflamatorias, la neovascularización y la remodelación fibrosa, elementos que en conjunto, constituyen una respuesta a la injuria valvular causada por el estreptococo B hemolítico del grupo A, cuyos mecanismos celulares y moleculares, aún no están del todo aclarados (16).

La fibrosis fue más extensa en el grupo B y la inflamación mayor en el grupo A. Nos llamó la atención la presencia de calcificación en el tejido valvular añadido y sobre todo en las comisuras del aparato valvular de algunos casos del grupo B donde la remodelación colágena fue más severa y con mayor estenosis mitral. La calcificación de los tejidos cicatrizados o calcificación distrófica está descrita en los primeros trabajos de los patólogos alemanes, para distinguirla de la calcificación metastásica de los tejidos sanos. Actualmente, ha sido objeto de numerosos trabajos que señalan el mecanismo íntimo de la calcificación tisular especialmente cuando se conjuga con una osificación heterotópica como ha sido descrita en las fases finales de las enfermedades valvulares como en nuestros casos. La relación que tiene con la angiogénesis se explica por los factores de crecimiento comunes que ambos fenómenos tisulares presentan (factor de crecimiento fibroblástico, VEGF y otros) y por la acción de los pericitos (17).

La neovascularización o angiogénesis de las valvas en relación con las etapas de la valvulopatía estudiada, también presentó cambios en relación con la progresión de las lesiones. El término de angiogénesis involucra el concepto de remodelación vascular y maduración como se ha comprobado en este análisis (18). Normalmente, las valvas son estructuras avasculares. La presencia de neovasos es indicadora de procesos patológicos, generalmente inflamatorios. Universalmente, se ha propuesto que la formación de

nuevos vasos se origina de las células endoteliales que recubren las valvas o del endotelio vascular de los vasos pre-existentes los cuales normalmente pueden observarse en la raíz de las valvas (19). No podemos descartar el origen de los neovasos a partir de células progenitoras endoteliales, como ha sido descrito en los tumores, siendo en estos casos, la angiogénesis considerada como un proceso de vasculogénesis (20).

En este estudio, se observó que la angiogénesis es constante en la valvulitis reumática crónica, la cual se acompañó siempre de tejido añadido en la válvula como ha sido también descrita en varios tipos de valvulopatías no reumáticas por otros autores (21). En las etapas más tardías, fue menos importante y casi ausente en el tejido cicatricial acelular del 5 % de nuestros casos.

En las fases iniciales de la valvulitis reumática como en todo proceso inflamatorio, predominaron los factores vasculares y el infiltrado inflamatorio, los cuales generalmente preceden la angiogénesis (22). Su presencia en las etapas intermedias o de transición entre la valvulitis aguda, la valvulitis crónica y la secuela del daño valvular, indica que juega un rol importantísimo para mantener, y alimentar el proceso de fibrosis.

Sabemos que en condiciones fisiológicas, la angiogénesis promueve procesos reguladores que estabilizan los vasos formados y que detienen el proceso de crecimiento celular. También, forma parte del cortejo de elementos celulares que intervienen en la respuesta inmunológica humoral y celular del daño valvular, donde las células endoteliales e intersticiales juegan un importante papel. Los vasos neoformados aportan nutrientes al tejido nuevo o añadido con el consecuente engrosamiento de la valva y de las cuerdas tendinosas. Igualmente permiten el reclutamiento de una mayor cantidad de células inflamatorias y su trasmigración hacia el tejido valvular, perpetuando de esta manera el proceso inflamatorio por un mayor período de tiempo, favoreciendo una mayor cicatrización. 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.

Esta observación es importante ya que pudimos apreciar en un trabajo previo (11), como la

neovascularización (angiogénesis) está mayormente presente en las valvas de individuos jóvenes correspondientes a las etapas más tempranas de la enfermedad valvular crónica reumática y como ésta va disminuyendo a medida que avanza en tiempo y progresa el daño valvular fibrótico, razones por lo que se infiere que la angiogénesis podría ser un factor determinante en la remodelación colágena progresiva de la valvulopatía aunado al factor hemodinámico de acción continua sobre el tejido valvular.

Por otra parte, la metodología de la cuantificación de la neovascularización empleada en este trabajo, difiere de la utilizada en los estudios de la neovascularización de los tumores malignos y en este tipo de patología, es relativamente nueva, pues no hemos encontrado en las dos últimas décadas, trabajos que analicen la angiogénesis en la enfermedad valvular reumática mitral.

Algunos autores la han estudiado en casos de estenosis aórtica no reumática, mediante métodos inmunohistoquímicos como hicimos e igualmente, consideraron el papel potencial que tiene la angiogénesis como factor de progresión (23,24). También la densidad vascular ha sido analizada en válvulas sigmoideas aórticas en relación al engrosamiento fibroso como se hizo en este trabajo (24).

Conclusiones

Del análisis de las características macro-microscópicas de 40 casos de biopsias de valvulopatía crónica reumática en dos etapas evolutivas y de su relación con los aspectos de la angiogénesis observada y evaluada con métodos inmunohistoquímicos, se concluyó que la angiogénesis es constante en las fases de la valvulitis crónica reumática y que forma parte del cortejo de elementos tisulares inflamatorios y reparativos, haciendo hincapié, en que representa un factor potencial de progresión y de agravamiento de la remodelación colágena reparativa. Considerando que la angiogénesis presenta variantes morfológicas producidas por diferentes factores moduladores, es probable que estos puedan constituirse en blancos terapéuticos para inhibir este proceso y disminuir la cicatrización del aparato valvular mitral.

REFERENCIAS

- Olivier C. Rheumatic fever-is it still a problem? *J Antimicrob Chemother.* 2000;45(Suppl):13-21.
- Muñoz A S. Aportes al conocimiento, diagnóstico, tratamiento, control y prevención de la fiebre reumática y la cardiopatía. *Gac Méd Caracas.* 1997;105(3):304-313.
- Turi Z. Mitral valve disease. *Circulation.* 2004;109:38-41.
- Marcus R, Sareli P, Pocock W, Barlow J. The spectrum of severe rheumatic mitral valve disease in a developing country. Correlations among clinical presentation, surgical pathology findings and hemodynamic sequelae. *Ann Int Med.* 1994;120:177-183.
- Rullan E, Sigal L. Rheumatic fever. *Curr Rheumatol Rep.* 2001;3:445-452.
- Esteves JA, Suárez C. Estudio morfológico y distribución de los mucopolisacáridos ácidos en valvulopatías mitrales. Análisis de 94 biopsias valvulares mitrales. *Bol Hosp Univer Caracas.* 1998;18:31-42.
- Narula J, Chandrasekhar Y, Rahimtoola S. Diagnosis of active rheumatic carditis: The echoes of change. *Circulation.* 1999;100:1576-1581.
- Kawamoto T, Togi K. 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.
- Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol.* 1995;147:9-19.
- Abdulkadir SA, Carvalhal GF, Kaleem Z, Kisiel W, Humphrey PA, Catalona WJ, et al. Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma. *Hum Pathol.* 2000;31:443-447.
- Suárez C, Díaz MV, Hamana L, Mora V. Enfermedad reumática cardiovascular: observaciones anatomopatológicas en biopsias valvulares de jóvenes menores de 20 años de edad. Aceptado para su publicación. *Avances Cardiol.* Mayo 2008.
- Roberts S, Kosanke S, Dunn ST, Jankelow D, Duran C, Cunningham MW. Pathogenic mechanisms in rheumatic carditis: Focus on valvular endothelium. *J Infect Dis.* 2001;183:507-511.
- Kaplan E. Rheumatic fever. En: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, et al, editores. *Harrison's principles of internal medicine.* 14ª edición. Nueva York: McGraw-Hill Co., Inc; 1998. p.1309-1311.
- Schoen F, Sutton M. Contemporary issues in the pathology of valvular heart disease. *Hum Pathol.* 1987;18:568-575.
- Waller B, Howard J, Fess S. Pathology of mitral valve stenosis and pure mitral regurgitation- Part II. *Clin*

- Cardiol. 1994;17:395-402.
16. Durbin A, Gotlieb A. Advances towards understanding heart valve response to injury. *Cardiovasc Pathol.* 2002;11:69-77.
 17. Binotto MA, Guilherme L, Tanaka AC. Rheumatic Fever. *Images Paediatr Cardiol.* 2002;11:12-25.
 18. Bhushan M, Young H, Brenchley P, Griffiths C. Recent advances in cutaneous angiogenesis. *Br J Dermatol.* 2002;147:418-448.
 19. Passanti A, Taylor R, Pili R, Guo Y, Long P, Haney J. Methods in laboratory investigation. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest.* 1992;67:519-528.
 20. Komarova N, Mironov V. On the role of endothelial progenitor cells in tumor neovascularización. *J Theor Biol.* 2005;235:338-349.
 21. Sims D. Recent advances in pericyte biology- Implications for health and disease. *Can J Cardiol.* 1991;7:431-443.
 22. Joris I, Cuénoud H, Doern G, Underwood J, Majno G. Capillary leakage in inflammation. A study by vascular labeling. *Am J Pathol.* 1990;137:1353-1363.
 23. Weind K, Ellis C, Boughner D. Aortic valve cusp vessel density: Relationship with tissue thickness. *J Thorac Cardiovasular Surg.* 2002;12:333-340.
 24. Soini Y, Salo T, Satta J. Angiogenesis is involved in the pathogenesis of non-rheumatic aortic valve stenosis. *Hum Pathol.* 2003;34:756-763.

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.

...viene de *Gac Méd Caracas* 2008;116(3):247.

Los intelectuales: grandes enemigos de los libros

Dr. Fernando Báez

Hitler llegó a emocionarse. Y Goebbels, seguro de los efectos de este éxito, pidió a los jóvenes no detenerse. El 19, se mantuvo el horror en el Museo Federico, en Kassel, y en la Mebplatz, de Mannheim. El 17 de junio hubo una quema en Karlsruhe. El 21 de junio, en tres regiones se quemaron libros. Por una parte, estaba Darmstadt, en cuya Mercksplatz se llevaron a cabo los hechos; por otra, Essen y la mítica ciudad de Weimar. El 23 la Asociación de Estudiantes y una multitud quemó libros en la Plaza Adolfo Hitler de Mainz. El 26 de agosto, la NSBO y la Juventud Hitleriana prepara su quema en la plaza del mercado de Jena. Varios años más tarde, específicamente el 30 de abril de 1938, la Residenzplatz, de la famosa Salzburgo, fue utilizada por estudiantes y militares para una destrucción masiva de ejemplares condenados.

Lo curioso, lo inevitable, es que mientras esto pasaba, los estadounidenses, que estaban escandalizados, aterrorizados por tal barbarie, destruían ejemplares del *Ulises* de James Joyce en Nueva York y arrasaban con cientos de libros que consideraban inmorales.

Vladimir Nabokov, profesor en las universidades de Stanford y Harvard, quemó el Quijote en el Memorial Hall, ante más de seiscientos alumnos. En 1939, los bibliotecarios de St. Louis Public Library rechazaron *Uvas de Ira* de John Steinbeck y quemaron el libro en una pira pública, que sirvió para que los oradores advirtieran al resto de los escritores estadounidenses que no tolerarían lenguajes obscenos ni doctrinas comunistas. Los poetas Nadaístas colombianos quemaron ejemplares de la novela *María* de Jorge Isaacs, convencidos de que era necesario destruir el pasado literario del país.

Borges, en *Un ensayo autobiográfico*, reconoció que quemó libros al decir: «Hasta hace algunos años, si el precio no era excesivo, solía comprar ejemplares de ellos y los quemaba.» Hasta sus últimos años de vida, se negó a reeditar tres obras suyas de la segunda década del siglo XX: *Inquisidones* (1925), *El tamaño de mi esperanza* (1926) y *El idioma de los argentinos* (1928).

Continúa en pág. 322...