

CARACTERIZAÇÃO DA CALCIFICAÇÃO “IN VIVO” DE VÁLVULAS CARDÍACAS

R. F. Weska¹, G. M. Nogueira¹, C. G. Aimoli¹, A. A. Leirner², M. J. S. Maizato², O. Z. Higa³, B. Polakiewicz⁴, R. N. M. Pitombo⁴, M. M. Beppu^{1*}

*Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, CP 6066, 13083-970, Campinas-SP, Brasil

beppu@feq.unicamp.br

¹Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP

²Divisão de Bioengenharia do Instituto do Coração (InCor), HC-FMUSP

³Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN

⁴Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP

RESUMO

A calcificação patológica é normalmente a causa mais comum da falha clínica e deterioração da estrutura de válvulas cardíacas. Apesar de comum, pouco se sabe sobre o fenômeno e menos ainda se sabe sobre o material cerâmico obtido a partir deste tipo de calcificação. Este trabalho descreve a caracterização realizada em válvula cardíaca natural e implantada, calcificadas “in vivo”. SEM-EDS foi utilizada para analisar a morfologia e a composição química e XANES, para analisar a estrutura da fase inorgânica formada. Os resultados mostram que a calcificação é bastante espalhada nos tecidos e informações sobre a estrutura permitem especular que os depósitos calcificados em válvulas naturais e implantadas apresentam características estruturais semelhantes. Na calcificação “in vivo”, provavelmente as válvulas sofreram fadiga mecânica e tensões de cisalhamento por fluxo, o que explica a menor incidência de depósitos esféricos e cristalinos como os observados na calcificação “in vitro” observados na literatura.

Palavras-chave: biomateriais, válvula cardíaca, calcificação, XANES.

INTRODUÇÃO

A calcificação é a causa mais freqüente da falha de válvulas cardíacas naturais e implantadas. Depósitos de cálcio podem impedir o movimento de abertura e fechamento da válvula, causando problemas como estenose e regurgitação, sendo necessária a substituição da válvula^(1, 2).

O fluido corpóreo de mamíferos é supersaturado com relação à precipitação de hidroxiapatita. A ocorrência da calcificação requer energia para a mudança de fase da

solução para a forma de cristal sólido, e a energia necessária pode ser diminuída pela presença de sítios de nucleação, como defeitos de superfície, resíduos de células mortas, fibrilas de colágeno, mitocôndrias, lipídios, e certas proteínas reguladoras, que servem de substrato para a calcificação heterogênea em válvulas cardíacas^(1, 3).

No caso de válvulas bioprostéticas, fabricadas a partir de tecidos cardíacos de suínos e bovinos, além dos fatores já mencionados, a calcificação também é causada pelo tratamento ao qual o material é submetido antes de ser implantado^(4, 5). O tratamento com glutaraldeído tem sido o procedimento padrão para prevenir a degradação, aumentar a durabilidade, e reduzir a antigenicidade de válvulas bioprostéticas^(5, 6). Apesar disto, as válvulas ainda falham, principalmente devido à degradação estrutural e à calcificação. A estabilização de tecidos pelo glutaraldeído promove a morte celular, e foi demonstrado que sua atividade persiste por muitos meses após o implante, lentamente liberando monômeros de glutaraldeído ativos, matando fibrócitos e macrófagos que entram em contato com o material tóxico^(1, 4).

A calcificação de válvulas naturais e implantadas ocorre após um período de alguns anos, diferentemente da calcificação de muitos modelos “in vitro”, que ocorre imediatamente. Este fato pode indicar a presença de alguns fatores “in vivo” que agem para inibir a calcificação de válvulas, como a osteopontina⁽³⁾.

Em geral, depósitos minerais de fosfato de cálcio são quimicamente e cristalograficamente similares aos minerais que compõem os ossos, e acredita-se que a calcificação de válvulas cardíacas parece ser um processo regulado de forma similar à formação de ossos, com a nucleação de cristais de apatita, crescimento, e possível degradação em associação com uma matriz extracelular que regula a mineralização do tecido^(3, 5, 7).

Até hoje se busca um método de prevenir a calcificação de válvulas cardíacas^(2, 4), e para tal, é importante entender como a calcificação ocorre e caracterizá-la, tanto em válvulas naturais, quanto em válvulas implantadas. Para tal, pode-se utilizar a análise de XANES (*X-ray absorption near-edge structure*) na borda K de absorção do cálcio, uma vez que se sabe que a variação na região de XANES é sensível à estrutura local ao redor do cálcio devido a múltiplos espalhamentos de foto-elétrons. A análise de XANES pode ser utilizada para extrair informações eletrônicas e estruturais de um

determinado elemento, com mínimos danos à amostra, pois pode ser realizada sob pressão atmosférica^(8, 9).

Este trabalho descreve a caracterização realizada em válvula cardíaca natural e implantada, calcificadas “in vivo”. Análises de SEM-EDS foram utilizadas para analisar a morfologia e a composição química, e análise de XANES, para analisar a estrutura da fase inorgânica formada.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras analisadas

Seis amostras de válvulas cardíacas calcificadas “in vivo”, explantadas de diferentes pacientes, foram fornecidas pelo Instituto do Coração – InCor (HC-FMUSP, Brasil), armazenadas em solução de formaldeído 10%. As amostras consistiam de fragmentos de válvulas cardíacas naturais (natural 1, 2 e 3) e de válvulas implantadas, produzidas a partir de pericárdio bovino (implantada 1, 2 e 3). As amostras foram lavadas em solução de NaCl 0,9%, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 24 h (Liobras, L101).

Análises de SEM e EDS

As amostras de pericárdio foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (*scanning electron microscopy* – SEM), utilizando um microscópio Leica (LEO440i), para a observação dos depósitos de calcificação formados. A análise elementar dos depósitos foi realizada por espectroscopia por energia dispersiva de raios X (*energy dispersive spectroscopy* – EDS) (Jeol, 3XA-840A). As amostras liofilizadas foram fixadas em suporte metálico, utilizando fita dupla-face de carbono, e recobertas com carbono.

Análise de XANES

Foram realizadas análises de XANES das amostras calcificadas “in vivo” e de diferentes padrões de compostos de cálcio, na linha de luz D04B-XAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS (Campinas, Brasil). Os padrões foram preparados a partir de soluções de óxido de cálcio, carbonato de cálcio, e fosfato de cálcio, dissolvidos em isopropanol. As soluções foram homogeneizadas em ultra-som e filtradas em sistema Milipore[®]. Após a evaporação completa do solvente, os papéis de filtro contendo os padrões, assim como as amostras de válvulas cardíacas e pericárdio, foram fixados em suporte próprio para análise, utilizando uma fita adesiva de elementos leves.

Os espectros foram coletados na região ao redor da borda K de absorção do cálcio (4050 eV), em condições de temperatura ambiente, utilizando um monocromador de duplo cristal de silício. As amostras foram diretamente expostas ao feixe de raios X incidente. O caminho de incidência do feixe foi preenchido com gás hélio para evitar efeitos de absorção ou espalhamento dos raios X pelo ar. Os padrões foram analisados por transmissão, e as amostras, por fluorescência, utilizando um detector de germânio. Cada amostra foi analisada três vezes.

Os espectros de XANES foram posteriormente tratados utilizando o software Athena[®], do pacote IFFEFIT[®], para o alinhamento e obtenção da média dos espectros de cada amostra, e normalização dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 1 e 2 apresentam, respectivamente, as micrografias obtidas por SEM, com aumentos de 1000x e 5000x, das amostras de válvula cardíaca natural e implantada calcificadas “in vivo”.

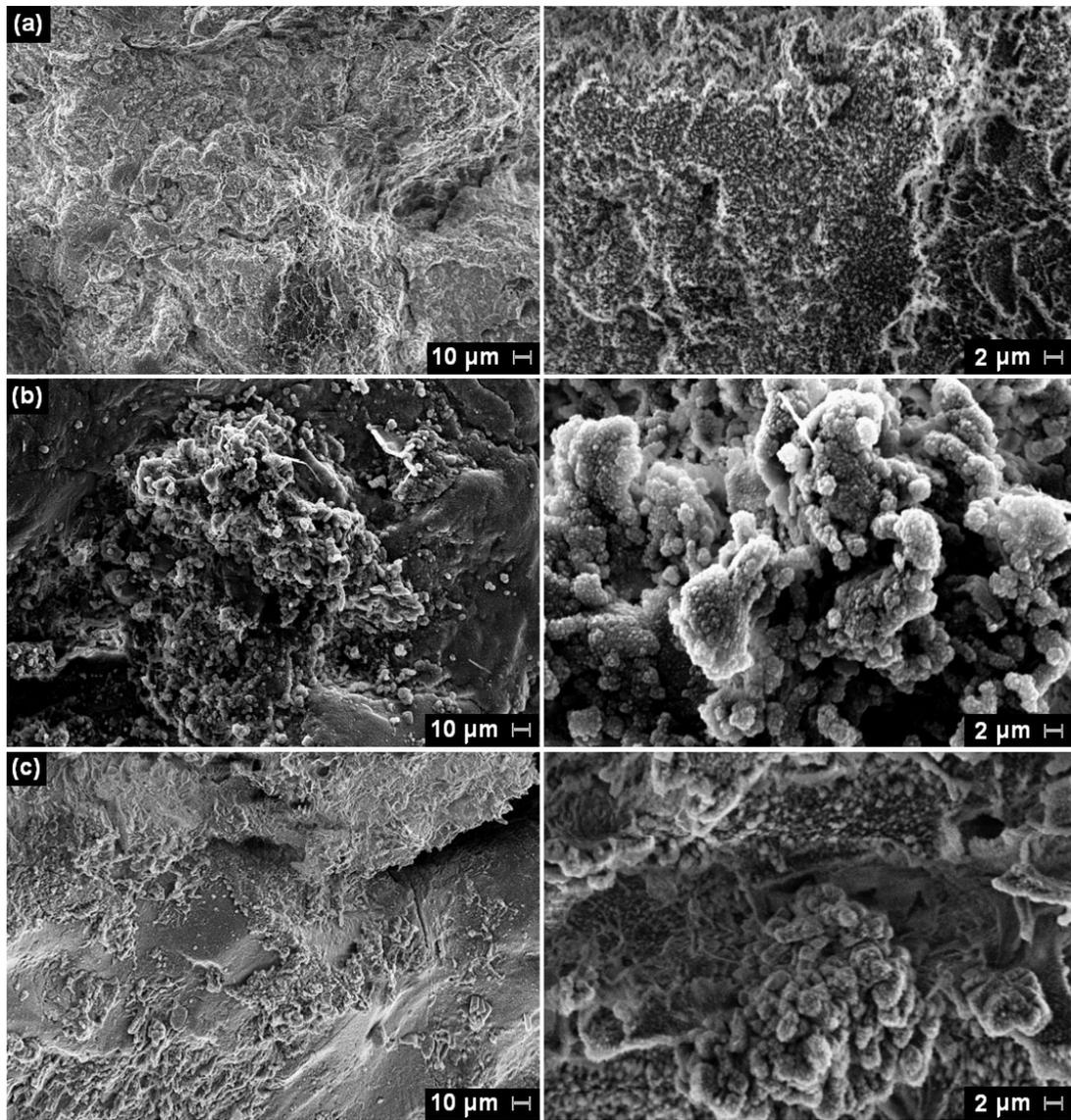


Figura 1: Micrografias obtidas por MEV das amostras de válvulas cardíacas naturais calcificadas “in vivo”, (a) natural 1, (b) natural 2, (c) natural 3.

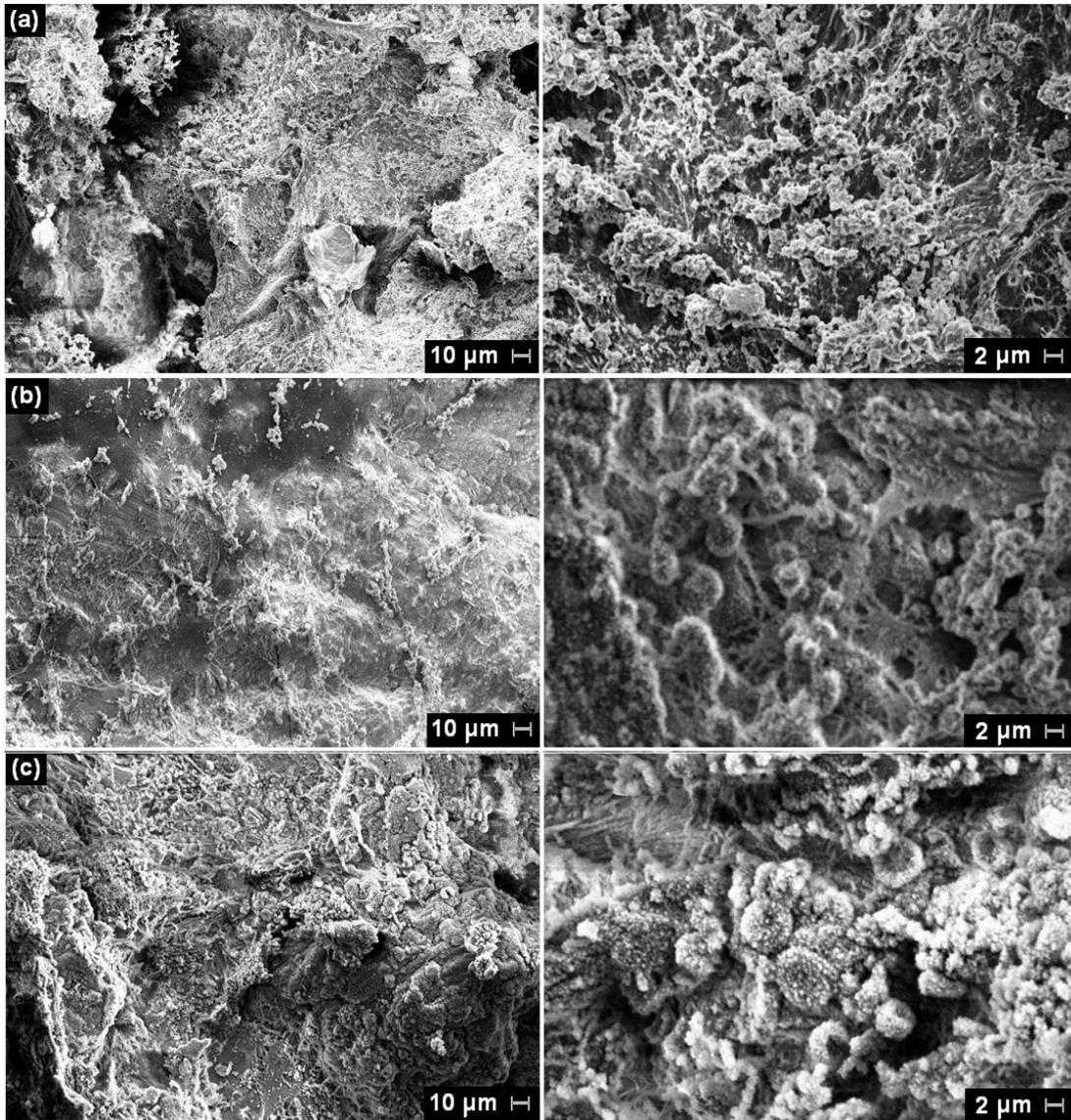


Figura 2: Micrografias obtidas por MEV das amostras de válvulas cardíacas implantadas calcificadas “in vivo”, (a) implantada 1, (b) implantada 2, (c) implantada 3.

É possível observar nas Figuras 1 e 2 que a calcificação se apresenta bastante espalhada sobre a superfície dos tecidos, e pode ser observada a formação de depósitos esferoidais e cristalinos. Porém, em algumas das amostras calcificadas “in vivo”, a microestrutura da superfície se apresenta diferente, com menor incidência de depósitos esferoidais. Durante o processo de calcificação “in vivo”, estas amostras provavelmente estavam localizadas em regiões mais susceptíveis a tensões de

cisalhamento ocasionadas pelo fluxo de fluidos corpóreos, além de estarem sendo submetidas à fadiga mecânica, sofrendo estresses transientes e de compressão devido ao movimento de abertura e fechamento da válvula cardíaca⁽¹⁾.

A análise de EDS das amostras indicou a presença de depósitos de fosfato de cálcio, com relações estequiométricas molares de Ca/P semelhantes à da hidroxiapatita^(1,7). Fitzpatrick e colaboradores⁽¹⁰⁾, utilizando micro análise por energia dispersiva de raios X, observaram que os depósitos de calcificação formados em artérias coronárias humanas ateroscleróticas apresentavam composição química idêntica à da hidroxiapatita óssea.

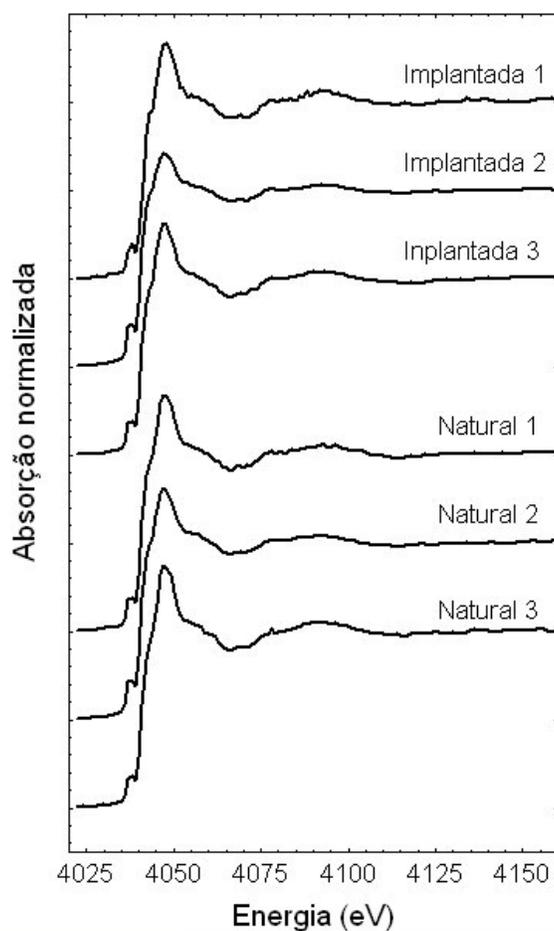


Figura 3: Espectros de XANES das amostras de válvulas cardíacas naturais e implantadas calcificadas “in vivo”.

O espectro de XANES refere-se aos picos secundários e ombros que modificam a aparência da borda de absorção de um determinado elemento, e da região próxima, além da borda, servindo como uma impressão digital para identificar certas características estruturais de uma espécie química⁽¹¹⁾.

A Figura 3 apresenta os espectros de XANES das amostras de válvulas cardíacas naturais e implantadas, calcificadas “in vivo”. Os espectros apresentam semelhanças tanto entre as amostras do mesmo tipo de válvula, quanto entre diferentes os tipos, indicando que os depósitos calcificados nestes dois tipos de substratos apresentam características estruturais semelhantes. Esta possível semelhança é um dado importante que pode auxiliar no desenvolvimento unidirecional de tratamentos anti-calcificantes que possam ser aplicados tanto para pacientes que possuem válvulas naturais, quanto para os que possuem válvulas implantadas, uma vez que ainda se busca um método comprovadamente eficiente a longo prazo que previna a calcificação de válvulas cardíacas^(2, 4).

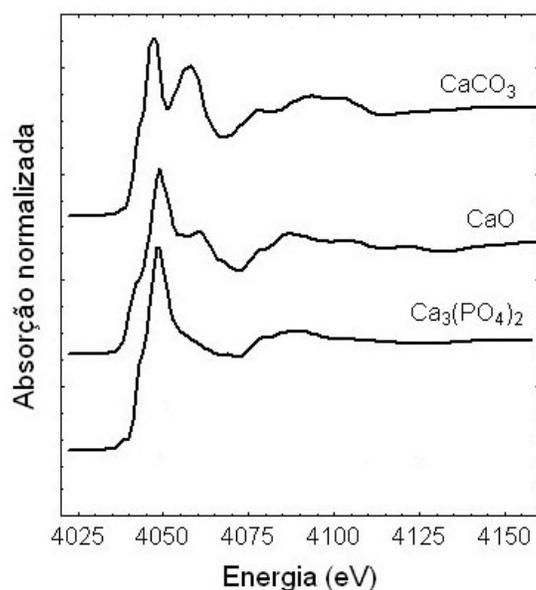


Figura 4: Espectros de XANES dos padrões de compostos de cálcio.

Na Figura 4, os espectros de XANES dos padrões de CaO, CaCO₃ e Ca₃(PO₄)₂ são apresentados.

Os padrões de cálcio analisados apresentaram espectros com características diferentes na região posterior à borda K de absorção do cálcio, o que pode ser atribuído a diferenças na vizinhança ao redor dos átomos de cálcio. O fato de que os íons de cálcio assumem diferentes geometrias, números de coordenação e estados de oxidação nas estruturas cristalinas destes compostos deve ocasionar a diversidade observada nos espectros^(9, 12).

Na comparação entre os espectros dos padrões de cálcio com os espectros das amostras, o espectro de fosfato de cálcio é o que mais se assemelha ao das amostras calcificadas, indicando a presença de compostos formados por cálcio e fósforo. Quando amostras analisadas consistem de mais de duas espécies, o espectro de XANES representa a mistura proporcional de cada espécie⁽⁹⁾, fato que provavelmente ocorre nos espectros das amostras, pois se sabe que a calcificação é formada por uma mistura de hidroxiapatita e seus precursores⁽¹³⁾. Os espectros de XANES das amostras foram semelhantes aos obtidos por Wang e colaboradores⁽⁸⁾, que analisaram amostras de ossos de ratos e verificaram que os espectros de XANES eram semelhantes ao da hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$.

CONCLUSÕES

A partir das análises de SEM-EDS foi observado que na calcificação “in vivo”, provavelmente as válvulas sofreram fadiga mecânica e tensões de cisalhamento por fluxo, o que explica a menor incidência de depósitos esferoidais e cristalinos como os observados na calcificação “in vitro” observados na literatura. Os resultados de XANES obtidos permitem especular que os depósitos calcificados “in vivo” em válvulas naturais e implantadas apresentam características estruturais semelhantes, indicando possíveis mecanismos de calcificação semelhantes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fapesp pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. VESELY, I. The evolution of bioprosthetic heart valve design and its impact on durability. *Cardiovascular Pathology*, v. 12, p. 277-286, 2003.
2. CLARK, J. N.; OGLE, M. F.; ASHWORTH, P.; BIANCO, R. W.; LEVY, R. J. Prevention of calcification of bioprosthetic heart valve cusp and aortic wall with ethanol and aluminum chloride. *The Annals of Thoracic Surgery*, v. 79, p. 897-904, 2005.
3. FARZANEH-FAR, A.; PROUDFOOT, D.; SHANAHAN, C.; WEISSBERG, P. L. Vascular and valvar calcification: recent advances. *Heart*, v. 85, p. 13-17, 2001.
4. PATHAK, C. P.; ADAMS, A. K.; SIMPSON, T.; PHILLIPS, JR., R. E.; MOORE, M. A. Treatment of bioprosthetic heart valve tissue with long chain alcohol solution to lower calcification potential. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 69A, p. 140-144, 2004.
5. BONUCCI, E. *Biological calcification – normal and pathological processes in the early stages*. Springer: Berlin, 2007.
6. SHAH, S. R.; VYAVAHARE, N. R. The effect of glycosaminoglycan stabilization on tissue buckling in bioprosthetic heart valves. *Biomaterials*, v. 29, p. 1645-1653, 2008.
7. NIMNI, M. E.; MYERS, D.; ERTL, D.; HAN, B. Factors which affect the calcification of tissue-derived bioprostheses. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 35, p. 531-537, 1997.
8. WANG, C.; EISA, M. H.; JIN, W.; SHEN, H.; MI, Y.; GAO, J.; ZHOU, Y.; YAO, H.; ZHAO, Y. Age-related elemental changes in bones. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 266, p. 1619-1622, 2008.
9. TAKAHASHI, Y.; MIYOSHI, T.; YABUKI, S.; INADA, Y.; SHIMIZU, H. Observation of transformation of calcite to gypsum in mineral aerosols by Ca K-edge X-ray absorption near-edge structure (XANES). *Atmospheric Environment*, doi: 10.1016/j.atmosenv.2008.04.012, 2008.
10. FITZPATRICK, L. A.; SEVERSON, A.; EDWARDS, W. D.; INGRAM, R. T. Diffusive calcification in human coronary arteries. *Journal of Clinical Investigation*, v. 94, p. 1597-1604.
11. CONRADSON, S. D. XAFS: a technique to probe local structure. *Los Alamos Science*, n. 26, 2000.
12. VEIGA, J. P.; FIGUEIREDO, M. O. Calcium in ancient glazes and glasses: a XAFS study. *Applied Physics A*, v. 92, p. 229-233, 2008.

13. MIKROULIS, D.; MAVRILAS, D.; KAPOLOS, J.; KOUTSOUKOS, P. G.; LOLAS, C. Physicochemical and microscopical study of calcific deposits from natural and bioprosthetic heart valves. Comparison and implications for mineralization mechanism. ***Journal of Materials Science: Materials in Medicine***, v. 13, p. 885-889, 2002.

CHARACTERIZATION OF “IN VIVO” CALCIFICATION OF HEART VALVES

ABSTRACT

Pathological calcification is usually the most common cause of fail and damage of heart valves. Although is a common phenomenon, few is known about it, and much less about the ceramic material obtained from this type of calcification. This paper describes the characterization performed in natural and bioprosthetic heart valves calcified “in vivo”. SEM-EDS was used to analyze morphology and chemical composition, and XANES, to analyze the structure of the formed inorganic phase. Results show that calcification is well spread over tissues and information about the structure allow speculating that the calcified deposits in natural and bioprosthetic heat valves present similar structural characteristics. In “in vivo” calcification, the valves were probably submitted to mechanical fatigue and shear stresses due to flow, explaining the lower incidence of spherical and crystalline deposits as observed in the literature for “in vitro” calcification.

Keywords: biomaterials, heart valve, calcification, XANES.