

ESTUDO DE NÓDULOS CALCIFICADOS EM VALVA AÓRTICA POR ESPECTROSCOPIA RAMAN COM E SEM FIBRA ÓPTICA

K.C. Rodrigues¹, F.L. Silveira¹, L. Silveira Jr.¹, G.C. de Souza², J.A.B. Piotto², C.J. De Lima¹, J.C. Lazaro¹, M.T.T. Pacheco¹, R.A. Zângaro¹

¹ Universidade do Vale do Paraíba - Univap/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D, Av. Shishima Hifumi, 2911 - São José dos Campos/SP, kalligaris@gmail.com

² Clínica de Cirurgia do Coração/Cirucor, Rua Santa Elza, 62 - São José dos Campos/SP

Resumo - A estenose da valva aórtica tem sido considerada conseqüência de um processo inflamatório crônico ativo, com alterações histológicas valvares muito semelhantes às encontradas nas placas ateroscleróticas. A espectroscopia Raman de placas ateroscleróticas tem apresentado resultados promissores na identificação/diferenciação de tecido calcificado, tecido aterosclerótico não calcificado e tecido normal em artérias humanas, além de permitir um diagnóstico minimamente invasivo com a utilização de cateter de fibra óptica. Entretanto, até o momento, não foram encontrados estudos relacionados com a estenose valvar pela mesma técnica. Nesse sentido, o presente trabalho apresenta a espectroscopia de valva aórtica (ex-vivo) obtida com e sem a utilização de um cateter especificamente desenvolvido para aplicações diagnósticas com Raman. Pode-se concluir, pelos resultados obtidos, que a utilização do cateter para obtenção dos espectros Raman permite uma adequada análise dos componentes presentes na amostra e que, a presença desses componentes sugere uma similaridade nos processos de calcificação da valva aórtica e de formação da placa aterosclerótica.

Palavras-chave: espectroscopia Raman, cateter, valva aórtica, estenose valvar, aterosclerose

Área do Conhecimento: Engenharias

Introdução

No Brasil, a causa mais comum da estenose da valva aórtica adquirida é a febre reumática. Ela é uma seqüela da valvulite reumática, que ocasiona espessamento e retração das válvulas semilunares e fusão das comissuras (HIGUCHI et al., 2003). Esse espessamento é ocasionado por degeneração das fibras de colágeno, aumento da elastina e alterações nos proteoglicanos (McDONALD et al., 2002). Desenvolvem-se, também, nódulos calcificados, e o orifício é reduzido à uma pequena abertura, tornando a valva regurgitante e estenótica ao mesmo tempo (DARE et al., 1993). A estenose da valva aórtica não-reumática, também é caracterizada pelo acúmulo de massas fibrocalcificadas irregulares sobre a face aórtica, na porção das lacíneas, que não se coapta (HIGUCHI et al., 2003). A estenose da valva aórtica tem sido considerada conseqüência de um processo inflamatório crônico ativo, com alterações histológicas valvares muito semelhantes às encontradas nas placas ateroscleróticas (OTTO et al., 1994).

Na atualidade, uma das aplicações mais avançadas da espectroscopia Raman é o estudo da aterosclerose vascular (NOGUEIRA et al., 2005; SILVEIRA JR et al., 2003). Essa técnica apresenta um grande potencial para análise bioquímica macroscópica ou microscópica do tecido biológico. E pode ser desenvolvida in vivo,

utilizando a tecnologia de fibras ópticas (BUSCHMAN et al., 2001b).

Embora muitos estudos tenham sido realizados na avaliação de artérias, nada foi encontrado, até o momento, sobre a análise de valvas cardíacas com espectroscopia Raman. Nesse sentido, o presente trabalho apresenta a espectroscopia de valva aórtica calcificada (ex-vivo) obtida com e sem a utilização de um cateter especificamente desenvolvido para aplicações diagnósticas com Raman (DE LIMA et al., 2000).

Materiais e Métodos

A amostra analisada apresenta seus folhetos fundidos por calcificação e foi obtida de paciente submetido à substituição da valva natural por uma prótese. A fim de definir as regiões para realização das medidas, a amostra foi fotografada sobre um plano quadriculado. Quatro regiões foram selecionadas por uma análise visual da presença de calcificação. Sendo a calcificação nas regiões 1 e 2 mais proeminente do que nas regiões 3 e 4.

O sistema de espectroscopia Raman é composto por um laser de Ti:safira (Spectra Physics, modelo 3900S) bombeado por um laser de Argônio (Spectra Physics, modelo Stabilité 2017) que, por meio de um conjunto de aparatos ópticos, provê um feixe laser de 785 nm. Quando acoplado ao cateter de fibras ópticas 6 em torno de 1, Figura 1, a amostra é irradiada com 60 mW. Entretanto, quando a irradiação é direta, Figura 2,

a amostra recebe 130 mW. Para todos os pontos observados, o sinal foi coletado por um tempo total de 60s em 3 aquisições de 20s cada.

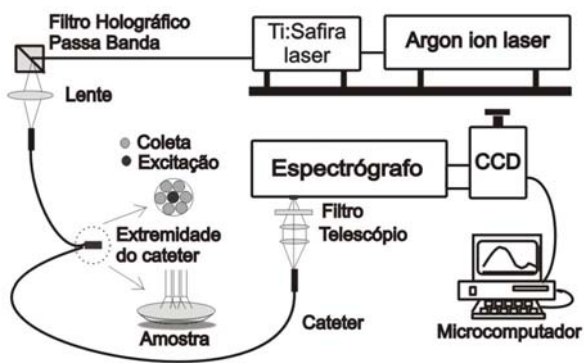


Figura 1- Sistema Raman de irradiação com cateter.

A calibração dos espectros Raman é realizada utilizando uma substância que possui bandas espectrais bem definidas e espaçadas entre 400 à 1800 cm^{-1} , faixa espectral de interesse para os componentes biológicos. Os espectros obtidos com o cateter são processados por uma interpolação polinomial para retirada das bandas espectrais do sinal da sílica da fibra óptica, que são proeminentes entre 800 à 1100 cm^{-1} (DE LIMA et al., 2000).

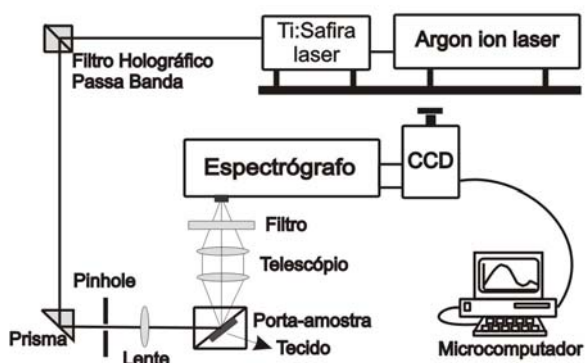


Figura 2 – Sistema Raman de irradiação direta, sem cateter.

Em seguida, os espectros Raman são processados para eliminar o sinal de background, ou fluorescência da amostra. Para este procedimento utiliza-se um filtro digital passa-alta, com o auxílio do software Matlab® (THE MATHWORKS). Este filtro foi montado através de uma interpolação polinomial de ordem 6 e 7, dependendo do perfil da fluorescência.

O sinal também é processado por um filtro FFT, a cada 5 pontos, utilizando o software ORIGIN 6.0, a fim de suavizar as curvas obtidas e remover sinais de alta frequência.

Resultados

A Figura 3 apresenta os espectros obtidos, com e sem o cateter, para as regiões selecionadas, 1 e 2, regiões onde a calcificação é mais proeminente.

A Figura 4 apresenta os espectros Raman obtidos para as regiões 3 e 4 com e sem o cateter.

Em todos os gráficos são apontadas as bandas espectrais mais evidentes.

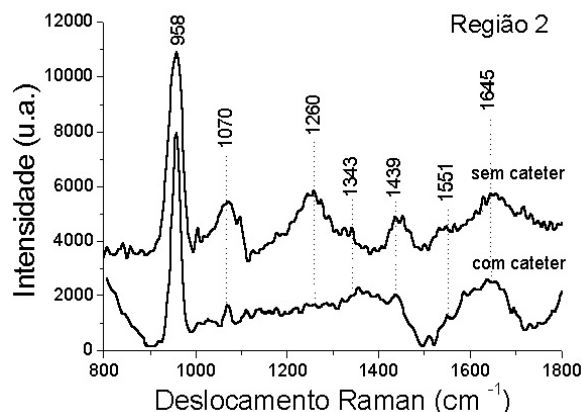
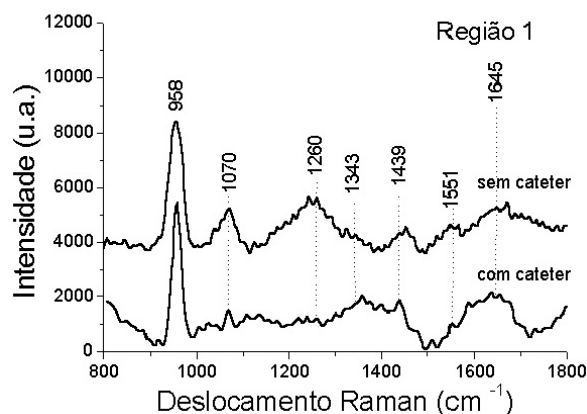
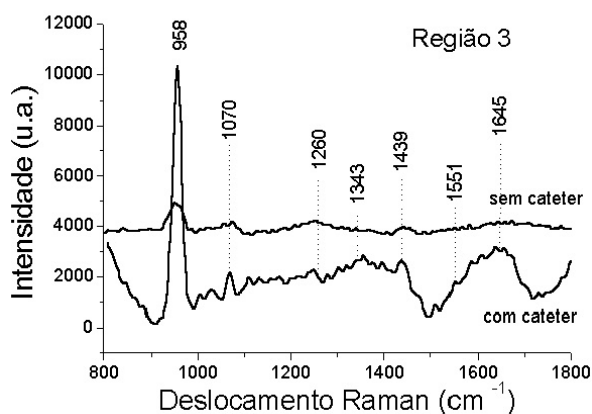


Figura 3 – Espectros Raman, obtidos com e sem cateter, para as regiões 1 e 2.



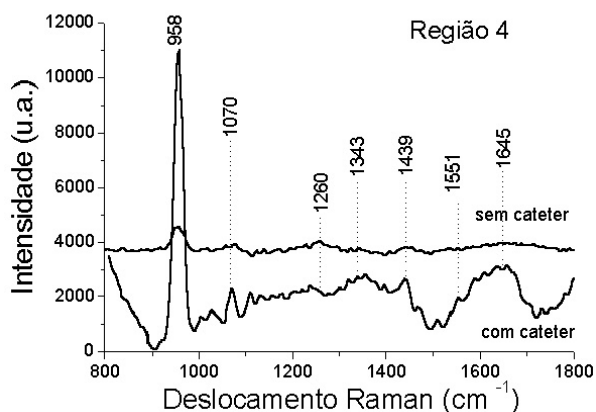


Figura 4 – Espectros Raman, obtidos com e sem cateter, para as regiões 3 e 4.

Discussão

A valva aórtica possui uma estrutura viscoelástica exibindo um complexo comportamento anisotrópico que não pode ser explicado simplesmente devido ao colágeno. A longevidade dessa estrutura depende da interação dos seus constituintes na matriz extracelular como o colágeno, a elastina e os proteoglicanos (SCOTT & VESELY, 1996). As cúspides valvares contêm cerca de 50% de colágeno (principalmente tipo I, mas também tipo III) e apenas 13% de elastina do seu peso seco (BASHEY et al., 1967).

A análise comparativa entre as valvas aórticas e as artérias coronárias, do ponto de vista tecidual e celular, demonstra que poucas células musculares lisas estão presentes nos folhetos valvares. Além disso, o grau de calcificação é maior na valva aórtica que na parede coronária. Já nas fases iniciais da doença de estenose valvar, pequenas áreas de inflamação e infiltração lipídica são interpostas com áreas de folheto valvar normal. Tardamente, as áreas anormais tornam-se confluentes com calcificação proeminente e fibrose aumentada, resultando em enrijecimento das valvas e obstrução do efluxo ventricular esquerdo (HIGUCHI et al., 2003).

Baseado nesses fatores patogênicos e reações teciduais comuns entre a estenose de valva aórtica e a doença coronária, os resultados aqui apresentados são discutidos à luz dos obtidos para aterosclerose, por BUSCHMAN et al. (2001a e 2001b).

As bandas em 958, 1070 e 1439 cm^{-1} correspondem à hidroxiapatita de cálcio, ao carbonato de cálcio e à mineralização de cálcio respectivamente (BUSCHMAN et al., 2001b), presente em todos os quatro pontos, marcadamente visíveis nos espectros obtidos com cateter.

As bandas em 1260, 1343 e 1645 cm^{-1} são devidas às proteínas presentes nas fibras

colágenas, lamina elástica e células de músculo liso (BUSCHMAN et al., 2001b).

A banda em 1551 cm^{-1} aparece devido a uma substância lipofílica, que, no caso das placas ateroscleróticas não calcificadas é o β -caroteno, (BUSCHMAN et al., 2001a).

O aparecimento de todas essas bandas nas quatro regiões analisadas, corrobora com a análise de HIGUCHI et al. (2003), a qual sugere que a estenose da valva aórtica é resultado de um distúrbio inflamatório ativo, com sucessivas camadas de progressão, com algumas similaridades com a aterosclerose.

As diferenças mais notáveis entre os espectros obtidos com e sem cateter, ocorrem para as regiões 3 e 4, Figura 4, onde os espectros obtidos sem cateter apresentam uma relação sinal/ruído muito baixa, dificultando a identificação das bandas em 1343, 1551 e 1645 cm^{-1} . Em contrapartida, os espectros obtidos sem cateter para as regiões 1 e 2, Figura 3, onde a calcificação é mais proeminente, apresentam boa relação sinal/ruído permitindo a identificação clara destas bandas.

Por outro lado, os espectros obtidos com o cateter apresentam uma ótima relação sinal/ruído e permitem a perfeita identificação de praticamente todas as bandas, ficando prejudicada apenas a identificação da banda em 1260 cm^{-1} .

Conclusão

Pelos resultados apresentados pode-se concluir que a utilização do cateter para obtenção dos espectros Raman permite uma adequada análise dos componentes presentes na amostra. Por outro lado, os resultados também sugerem que há uma similaridade nos processos de calcificação da valva aórtica e de formação da placa aterosclerótica.

Trabalhos futuros, com apoio de resultados histológicos, poderão ratificar os resultados aqui apresentados, bem como evidenciar que a utilização de cateter é plenamente viável no diagnóstico da estenose valvar.

Agradecimentos

O primeiro autor agradece ao programa de bolsas CAPES/PROSUP.

Referências

- BASHEY, R.I.; TORII, S.; ANGRIST, A. Age-related collagen and elastin content of human heart valves. **J. Gerontol.** V.20, p.203-8, 1967.
- BUSCHMAN, H.P.; MOTZ, J.T.; DEINUM, G.; TJEERD, J.R.; FITZMAURICE, M.; KRAMER, J.R.; VAN DER LAARSE, A.; BRUSCHKE, A.V.; FELD,

M.S. Diagnosis of human coronary atherosclerosis by morphology-based Raman spectroscopy. **Cardiovasc Pathol.** V.10, n.2, p.59-68, 2001a.

- BUSCHMAN, H.P.; DEINUM, G.; MOTZ, J.T.; FITZMAURICE, M.; KRAMER, J.R.; VAN DER LAARSE, A.; BRUSCHKE, A.V.; FELD, M.S. Raman microspectroscopy of human coronary atherosclerosis: biochemical assessment of cellular and extracellular morphologic structures in situ. **Cardiovasc Pathol.** V.10, n.2, p.69-82, 2001b.

- DARE, A.J.; VEINOT, J.P.; EDWARDS, W.D.; TAZELAAR, H.D.; SCHAFF, H.V. New observations on the etiology of aortic valve disease: a surgical pathologic study of 236 cases from 1990. **Hum Pathol.** V.24, n.12, p.1330-8, 1993.

- DE LIMA CJ, SATHAIAH S, SILVEIRA L, ZANGARO RA, PACHECO MT. Development of catheters with low fiber background signals for Raman spectroscopic diagnosis applications. **Artif Organs.** V.24, n.3, p.231-4, 2000.

- HIGUCHI, M.L.; DOS SANTOS, M.H.H.; DEMARCHI, L.M.M. Etiopatogenia: aspectos relevantes. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.** V.13, n.3, p.305-11, 2003.

- McDONALD, P.C.; WILSON, J.E., McNEILL, S.; GAO, M.; SPINELLI, J.J.; ROSENBERG, F.; WIEBE, H.; McMANUS, B.M. The challenge of defining normality for human mitral and aortic valves. **Cardiovasc Patho.** V.11, p. 193-209, 2002.

- NOGUEIRA GV, SILVEIRA L, MARTIN AA, ZANGARO RA, PACHECO MT, CHAVANTES MC, PASQUALUCCI CA. Raman spectroscopy study of atherosclerosis in human carotid artery. **J Biomed Opt.** V.10, n.3, p.031117, 2005.

- OTTO, C.M.; KUUSISTO, J.; REICHENBACH D.D.; GOWN, A.M.; O'BRAIN, K.D. Characterization of the early lesion of degenerative valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. **Circulation,** V.90, n.2, p.844-53, 1994.

- SCOOT, M.J.; VESELY, I. Morphology of porcine aortic valve cusp elastin. **J. Heart Valve Dis.** V.5, n.5, p.464-71, 1996.

- SILVEIRA JR, L.; SATHAIAH, S.; ZÂNGARO, R.A.; PACHECO, M.T.T.; CHAVANTES, M.C.; PASQUALUCCI, C.A.G. Near-infrared Raman spectroscopy of human coronary arteries: histopathological classification based on Mahalanobis distance. **J Clin Laser Med Surg.** V.21, n.4, p.203-8, 2003.