

ÍTALO MARTINS DE OLIVEIRA

**Análise anatomopatológica do sistema
nervoso autônomo cardíaco intrínseco na
fibrilação atrial permanente**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sampaio Gutierrez

SÃO PAULO

2011

ÍTALO MARTINS DE OLIVEIRA

**Análise anatomopatológica do sistema
nervoso autônomo cardíaco intrínseco na
fibrilação atrial permanente**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sampaio Gutierrez

SÃO PAULO

2011

Oliveira IM. Análise anatomopatológica do sistema nervoso autônomo cardíaco intrínseco na fibrilação atrial permanente. Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Aprovado em: ___/___/_____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

À minha esposa, Xênia Maia Xenofonte Martins, pelo amor, companheirismo e respeito sempre compartilhados nestes quase nove anos de convivência harmoniosa.

À minha filha Isabela Xenofonte Martins, pelo carinho, motivação e compreensão às minhas ausências, que só o tempo poderá explicá-la.

Ao meu filho Athos Xenofonte Martins, que ainda ao ventre materno me orgulha e me motiva nesta missão.

Aos meus pais, Francisco de Assis de Oliveira e Isolda Souto Martins, pelo amor incondicional, educação, paciência e perseverança que me ofereceram ao longo da vida.

À minha irmã, Yasmin de Oliveira Martins, pela amizade e companheirismo.

A todos os meus professores, que desde tenra idade me instigaram ao saber e ao senso crítico.

Agradecimientos

Em especial, ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Sampaio Gutierrez, pela paciência, dedicação e competência.

À Prof. Dra. Vera Demarchi Aiello, pelo incentivo e apoio neste projeto.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e o Instituto do Coração, pela oportunidade.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Cardiopneumologia da Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo pelo apoio, em especial à Neusa Rodrigues.

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento.

A todos os profissionais do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A todos os professores e colegas do Programa de Pós-graduação em Cardiopneumologia da Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo.

À minha esposa Xênia Maia Xenofonte Martins, pela ajuda na execução deste trabalho e pela compreensão das minhas incansáveis viagens.

À Dra. Ângela Paes e ao Dr. Wellington Lima, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

Aos colegas do Serviço de Anatomia Patológica pelo apoio nestes longos anos.

À Nádia Sambiase pelo apoio logístico na aquisição dos materiais em imunohistoquímica.

Às funcionárias do laboratório de Imuno-histoquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Maria Cristina Rodrigues Medeiros, Esmeralda Miristene Eher, Sandra de Moraes Fernezlían e em especial à Ângela Batista Gomes dos Santos, pela paciência e todo o trabalho desenvolvido neste projeto.

Epígrafe

“E sem saber que era impossível, ele foi lá e fez”

Jean Cocteau

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Fibrilação atrial.....	2
1.1.1. Definição e Epidemiologia da Fibrilação Atrial.....	2
1.1.2. Classificação Atual da Fibrilação Atrial.....	4
1.1.3. Patogenia da Fibrilação Atrial.....	5
1.1.4. Fibrilação Atrial e Fibrose Miocárdica.....	7
1.2. Sistema Nervoso Autônomo Cardíaco Intrínseco.....	9
1.2.1. Anatomia Fisiológica do Sistema Nervoso Autônomo.....	9
1.2.2. Sistema Nervoso Autônomo Cardíaco Intrínseco.....	10
1.2.3. Sistema Nervoso Autônomo e Fibrilação Atrial.....	13
1.2.4. Sistema Nervoso Autônomo e Veia Oblíqua do Átrio Esquerdo.....	14
1.3. Receptores Muscarínicos.....	15
1.3.1. Fisiologia dos Receptores Muscarínicos.....	15
1.3.2. Receptores Muscarínicos e Fibrilação Atrial.....	16
1.4. Objetivos.....	18
1.4.1. Objetivos específicos.....	18
2. Material e Método.....	20
2.1. Definição e Desenho do Estudo.....	21
2.2. Casuística.....	22
2.2.1. Critérios de Inclusão.....	23
2.2.2. Critérios de Exclusão.....	24
2.2.3. Sumário da Seleção dos Casos.....	24
2.3. Dados dos Pacientes.....	27

2.3.1. Variáveis Clínicas.....	27
2.3.2. Variáveis Ecocardiográficas.....	27
2.3.3. Dados Demográficos, Clínicos e Ecocardiográficos da Amostra.....	28
2.4. Fase Macroanatômica.....	30
2.4.1. Drenagem Venosa do Átrio Esquerdo.....	30
2.4.2. Átrio esquerdo, septo ventricular e <i>fat-pads</i>	32
2.4.3. Cortes Anatômicos.....	32
2.5. Fase Microanatômica.....	34
2.5.1. Processamento Histológico.....	34
2.5.2. Técnica de Imuno-Histoquímica.....	35
2.5.3. Análise Estrutural das Fibras Miocárdicas.....	36
2.5.4. Análise da Fibrose Miocárdica.....	38
2.5.5. Sistema Nervoso Autônomo Cardíaco Intrínseco.....	39
2.5.6. Receptores Muscarínicos.....	42
2.5.7. Concentração dos Anticorpos.....	46
2.6. Análise Estatística dos Dados.....	47
2.7. Aspectos Éticos.....	49
2.8. Financiamento.....	50
3. Resultados.....	51
3.1. Fase Macroanatômica.....	52
3.2. Fase Microanatômica.....	53
3.2.1. Análise Estrutural das Fibras Miocárdicas.....	53
3.2.2. Fibrose Miocárdica.....	59

3.2.3. Sistema Nervoso Autônomo Cardíaco Intrínseco.....	61
3.2.4. Receptores Muscarínicos.....	64
3.2.5. Sumário dos Resultados referentes ao Sistema Nervoso Autônomo e Receptores Muscarínicos	72
4. Discussão.....	74
4.1. Considerações sobre a Seleção da Amostra.....	77
4.2. Escolha dos Cortes Anatômicos a Serem Estudados.....	79
4.3. Análise dos Dados das Variáveis Clínicas, Ecocardiográficas e Anatômicas.....	81
4.4. Alterações Estruturais do Miocárdio e Relação com a Fibrilação Atrial Permanente.....	83
4.5. Relação entre Fibrose Atrial e Fibrilação Atrial Permanente: Causa, Efeito ou Nenhum?.....	85
4.6. Avaliação da Inervação Simpática e Parassimpática do Sistema Nervoso Autônomo Cardíaco Intrínseco da Fibrilação Atrial Permanente.....	88
4.7. Expressão dos Diversos Subtipos dos Receptores Muscarínicos no Miocárdio Atrial Humano e Relação com Fibrilação Atrial Permanente	91
4.8. Reflexões sobre as Limitações do Estudo.....	95
4.9. Considerações Finais.....	96
5. Conclusões.....	97
6. Referências.....	99
7. Anexos.....	109

7.1. Anexo I – Ficha do Coração.....	110
7.2. Aprovação da Comissão Científica do InCor/HCFMUSP.....	112
7.3. Aprovação da Cappesq.....	113
7.4. Financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.....	114
7.5. Normas Adotadas.....	115
7.6. Dados Brutos em Médias.....	116

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	por cento
°	graus
°C	graus Celsius
AD1	cutre do átrio direito, no teto livre
AD2	cutre do átrio direito, no istmo cavo-tricuspídeo, próximo ao óstio do seio coronário
AE1	cutre no átrio esquerdo, no trajeto médio da veia oblíqua do átrio esquerdo
AE2	cutre no átrio esquerdo, na junção da veia pulmonar superior esquerda
AE3	cutre no átrio esquerdo, na aurícula
Cappesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
cm	centímetros
cm ³	centímetros cúbicos
dp	desvio padrão
EEG	equações de estimação generalizadas
<i>et al</i>	e colaboradores
FA	fibrilação atrial
FAP	fibrilação atrial permanente
Fapesp	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FP	<i>fat-pad</i> epicárdico
FP1	<i>fat-pad</i> epicárdico atrial esquerdo superior

FP2	<i>fat-pad</i> epicárdico atrial direito posterior
FP3	<i>fat-pad</i> epicárdico atrial esquerdo póstero-medial
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IIQ	intervalo interquartil
InCor	Instituto do Coração
M1	receptor muscarínico subtipo 1
M2	receptor muscarínico subtipo 2
M3	receptor muscarínico subtipo 3
M4	receptor muscarínico subtipo 4
M5	receptor muscarínico subtipo 5
mμ ²	micrômetro quadrado
MLG	modelos lineares generalizados
OSC	ostio do seio coronariano
pH	potencial hidrogênio-iônico
S-100	proteína de baixo peso molecular, 100% solúvel em sulfato de amônio em pH neutro
SIV	septo ventricular
SNA	Sistema nervoso autônomo
TH	tirosina-hidroxilase
VoAe	veia oblíqua do átrio esquerdo
VM	veia de Marshall
x	vezes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho do aspecto posterior de um coração humano e os plexos ganglionares.....	12
Figura 2	Desenho do aspecto superior do coração humano e os plexos ganglionares.....	12
Figura 3	Representação esquemática e resumida da seleção dos casos estudados.....	25
Figura 4	Detalhes dos cortes anatômicos da drenagem venosa da parede atrial esquerda posterior.....	31
Figura 5	Corte do tecido do <i>fat-pad</i> atrial direito posterior corado pelo Masson.....	37
Figura 6	Desenho esquemático do método utilizado na leitura das lâminas na análise estrutural.....	39
Figura 7	Foto em aumento de 400x de fibras nervosas coradas fortemente para tirosina-hidroxilase.....	40
Figura 8	Foto em aumento de 200x de fibras nervosas coradas para proteína S-100.....	41
Figura 9	Foto sequencial da tela do sistema utilizado na detecção automática de cores do sistema de análise de imagens.....	43/44
Figura 10	Desenho esquemático do método utilizado na leitura das lâminas para os receptores muscarínicos.....	45
Figura 11	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos	

	receptores muscarínicos subtipo 1 (M1).....	66
Figura 12	Exemplo de fotomicroscopia com coloração para receptor muscarínico subtipo 1.....	66
Figura 13	Exemplo de fotomicroscopia com coloração para receptor muscarínico subtipo 5.....	71
Figura 14	Exemplo de fotomicroscopia com coloração para receptor muscarínico subtipo 5.....	72
Figura 15	Quadro resumo dos resultados na análise das fibras nervosas e de subtipos muscarínicos significativamente alterados nos diversos segmentos atriais analisados.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Descrição dos casos excluídos por pareamento, problema técnico dos cortes e limitação numérica.....	26
Tabela 2.2	Comparações entre os grupos em relação às características demográficas, clínicas e ecocardiográficas dos pacientes.....	28
Tabela 3.1	Comparações entre os grupos em relação a variáveis macroscópicas.....	52
Tabela 3.2	Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas.....	53
Tabela 3.3	Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas – AD1.....	54
Tabela 3.4	Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas – AD2.....	54
Tabela 3.5	Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas – AE1.....	55
Tabela 3.6	Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas – AE2.....	55
Tabela 3.7	Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas – AE3.....	56
Tabela 3.8	Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas – FP1.....	56
Tabela 3.9	Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas – FP2.....	57

Tabela 3.10	Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas – FP3.....	57
Tabela 3.11	Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas – SIV.....	58
Tabela 3.12	Comparações entre os grupos em relação à espessura média do endocárdio, miocárdio e epicárdio.....	58
Tabela 3.13	Comparações entre os grupos em relação à percentagem de fibrose no miocárdio.....	60
Tabela 3.14	Comparações entre os grupos em relação à percentagem de fibrose no miocárdio – por corte.....	60
Tabela 3.15	Comparações entre os grupos em relação ao sistema nervoso cardíaco intrínseco.....	62
Tabela 3.16	Comparações entre os grupos em relação ao sistema nervoso cardíaco intrínseco – por corte.....	63/64
Tabela 3.17	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores muscarínicos subtipo 1 (M1).....	65
Tabela 3.18	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores muscarínicos subtipo 2 (M2).....	67
Tabela 3.19	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores muscarínicos subtipo 3 (M3).....	68
Tabela 3.20	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores muscarínicos subtipo 4 (M4).....	69
Tabela 3.21	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores muscarínicos subtipo 5 (M5).....	57

Resumo

Oliveira IM. *Análise anatomopatológica do sistema nervoso autônomo cardíaco intrínseco na fibrilação atrial permanente* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2010.126p.

Eventuais alterações no substrato miocárdico, no sistema nervoso autônomo (SNA) cardíaco intrínseco, envolvendo os plexos ganglionares (PG) presentes nos *fat-pads* (FP) ou a expressão dos receptores muscarínicos, poderiam ser responsáveis pela gênese e manutenção da fibrilação atrial (FA). Com o objetivo de analisar a relação entre fibrilação atrial permanente (FAP) e possíveis alterações anatômicas e micromorfológicas do coração, do SNA cardíaco intrínseco e da expressão dos receptores muscarínicos miocárdicos, foram estudados 13 corações de autópsias de portadores de FAP e cardiopatia crônica definida (grupo I) e 13 casos pareados pela mesma doença cardíaca, porém sem esta arritmia (grupo II). Foram analisados a anatomia da drenagem venosa do átrio esquerdo (AE), peso do coração, espessura do septo ventricular e diâmetro dos FP epicárdicos. Foram ressecadas duas amostras no átrio direito (AD1 e AD2), três no átrio esquerdo - no trajeto médio da VoAe (AE1), na junção da veia pulmonar superior esquerda (AE2) e na aurícula (AE3), três em FPs, atrial esquerdo superior (FP1), atrial direito posterior (FP 2) e no atrial esquerdo pósteromedial (FP 3) e uma amostra do septo ventricular (SIV), como controle. As alterações estruturais das fibras miocárdicas, as espessuras do epicárdio, endocárdio e miocárdio e o percentual de colágeno intersticial no miocárdio foram analisados através de histomorfometria computadorizada sob coloração de tricrômio de Masson. O SNA cardíaco intrínseco foi analisado através de imunohistoquímica para S-100 e tirosina-hidroxilase quanto a: quantidade e área das fibras nervosas, quantidade e área média de fibras simpáticas, quantidade e

área média de fibras parassimpáticas e proporção de fibras simpáticas/parassimpáticas. A expressão miocárdica dos receptores muscarínicos 1 a 5 (M1 a M5) foi avaliada pela proporção positiva no miocárdio nos cortes AD1, AE1, AE2 e FP1. Não houve diferenças entre os grupos quanto às variáveis anatômicas e ao percentual de colágeno intersticial. A análise do SNA revelou fibras nervosas com menor área no grupo I, redução do número de fibras nervosas totais e parassimpáticas nos cortes AD1 e SIV, aumento de fibras totais e parassimpáticas AE2 e FP2 e aumento do número de fibras simpáticas nos cortes AD2, AE1, AE2 e AE3. Quanto à expressão dos receptores muscarínicos, houve aumento significativo na porcentagem positiva para M1 em todas as regiões, exceto na AE1 (média de todos os cortes, grupo I 5,84 e grupo II 2,92, $p=0,002$); o M2 e M3 apenas junto ao FP1 (M2 grupo I 5,67 e grupo II 3,63, $p=0,037$; M3 grupo I 30,95 e grupo II 20,13, $p=0,026$) e o M4 foi aumentado no grupo I na região AE1 (grupo I 9,90 e grupo II 4,45, $p=0,023$); não houve alteração estatisticamente significativa no M5. A anatomia e a disposição das fibras musculares atriais, bem como a fibrose intersticial não parecem estar relacionadas à FAP nos grupos estudados. Alterações no número de fibras nervosas bem como e alterações na expressão dos receptores muscarínicos atriais, especialmente o M1, particularmente em regiões próximas aos PG, parecem estar relacionadas à FAP, indicando a importância da modulação autonômica nesta arritmia.

Descritores: Fibrilação atrial; sistema nervoso autônomo, receptores muscarínicos.

Abstract

Oliveira IM. *Pathologic analysis of the intrinsic cardiac autonomic nervous system in permanent atrial fibrillation* [thesis]. Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2010.126 p.

Possible changes in myocardial substrate, in the intrinsic cardiac autonomic nervous system (ANS), involving the ganglionated plexus (GP) present in fat-pads (FP) or the expression of muscarinic receptors could be responsible for the genesis and maintenance of atrial fibrillation (AF). Aiming to analyze the relationship between permanent atrial fibrillation (PAF) and possible anatomical and micromorphological heart changes, intrinsic cardiac ANS and expression of myocardial muscarinic receptors, 13 hearts from autopsies of patients with PAF and chronic heart disease (group I) were studied; and 13 cases matched by the same heart disease, but without this arrhythmia (group II). It was analyzed the anatomy of the venous drainage of the left atrium (LA), heart weight, ventricular septal thickness and diameter of epicardial FP. Two samples were taken in the right atrium (RA1 and RA2), three in the left atrium - in the middle portion of the left atrium oblique vein (LaOv LA1), at the junction of left superior pulmonary vein (LA2) and in the auricle (LA3), three FPs, left atrial superior (FP 1), right atrial posterior (FP 2) and the left atrial posteromedial (FP 3) and one sample of the ventricular septum (VS), as control. The structural changes of the myocardial fibers, thickness of the epicardium, endocardium and myocardium, and the percentage of interstitial collagen in the myocardium were analyzed by computerized histomorphometry on Masson trichrome staining. The intrinsic cardiac ANS was analyzed through immunohistochemistry for S-100 and tyrosine hydroxylase regarding the: amount and area of nerve fibers, amount and average

area of sympathetic fibers, number and average area of parasympathetic fibers and sympathetic/parasympathetic fiber proportion. The myocardial expression of muscarinic receptors 1-5 (M1 to M5) was evaluated by positive ratio in the myocardium in sections RA1, LA1, LA2 and FP1. There were no differences between groups regarding the anatomical variant and the percentage of interstitial collagen. Analysis of the ANS revealed nerve fibers with the smallest area in group I, reduction in the number of total and parasympathetic nerve fibers of sections RA1 and VS, increase of total and parasympathetic fibers LA2 and FP2 and increased numbers of sympathetic fibers in sections RA2, LA1, LA2 and LA3. Regarding the expression of muscarinic receptors, there was a significantly increase in the positive percentage for M1 in all regions except for LA1 (average of all the sections, group I 5.84 and group II 2.92, $p = 0.002$), M2 and M3 just adjacent to the FP1 (M2 Group I 5.67 and Group II 3.63, $p = 0.037$; M3 Group I 30.95 and Group II 20.13, $p = 0.026$) and the M4 was increased in group I in the region LA1 (group I 9.90 and group II 4.45, $p = 0.023$) and there was no statistically significant change in the M5. The anatomy and arrangement of atrial muscle fibers, as well as the interstitial fibrosis did not appear to be related to PAF in both studied groups. Changes in the number of nerve fibers as well as changes in expression of atrial muscarinic receptors, specially the M1, particularly in regions close to the GP appear to be related to PAF, indicating the importance of autonomic modulation in this arrhythmia.

Descriptors: Atrial fibrillation, autonomic nervous system, muscarinic receptors.

1. Introdução

1.1 FIBRILAÇÃO ATRIAL

1.1.1 Definição e Epidemiologia da Fibrilação Atrial

A fibrilação atrial (FA) é uma taquiarritmia supraventricular caracterizada por ativação elétrica atrial caótica com consequente deterioração da atividade mecânica, não gerando sístole atrial. Essa desorganização elétrica inibe a atividade do nó sinusal enquanto a FA persistir.^{1,2}

É a arritmia supraventricular mais comum, ocorrendo em aproximadamente 1% na população geral^{3,4}, atingindo até 5% em pacientes acima de 65 anos⁵ e 9% entre os octagenários^{3,6}. Em dados norte-americanos, aproximadamente 2,3 milhões de pessoas são portadoras de FA no país, e é estimado o aumento para 10 milhões em 2054³.

Podem-se observar diferentes incidências entre os sexos. De acordo com o estudo de Framingham, a FA é 1,5 vezes mais frequente em homens, entretanto, em indivíduos acima de 70 anos, as prevalências tendem a se igualarem⁷. Neste mesmo estudo, a sobrevivência das mulheres (*Odds ratio*-OR 1,9) com FA é 40% menor que a dos homens (OR 1,5)⁷. Outro estudo ainda demonstrou uma maior prevalência em mulheres idosas, com 60% dos casos em pacientes acima de 75 anos⁸.

Embora o aumento do percentual de idosos na população geral explique parcialmente o aumento da prevalência da FA, o estudo de Framingham demonstrou

aumento significativo de 3,2% para 9,1% na prevalência ajustada para idade desta arritmia em homens e de 2,8 para 4,7% em mulheres entre 65 e 74 anos, entretanto neste último grupo sem significância estatística⁹. O incremento da OR é de 2,1 para homens e 2,2 para mulheres a cada década de vida em análise multivariada¹⁰. Outro estudo longitudinal norte-americano realizado em Minnesota revelou aumento da prevalência ajustada para idade com o tempo de observação em ambos os sexos.¹¹

A importância da epidemiologia da FA é observada em sua morbidade e mortalidade: eventos tromboembólicos, insuficiência cardíaca, distúrbios da cognição e aumento do índice de internações³. Em 1990, a FA foi a terceira causa dentre as arritmias cardíacas responsáveis por internamento nos Estados Unidos da América, somente menor que a taquicardia ventricular e a fibrilação ventricular¹².

Também na coorte de Framingham, foi demonstrado um aumento no risco de desenvolver FA em pacientes com diabetes (OR 1,4 para homens e 1,6 para mulheres), hipertensão arterial (OR 1,5 para homens e 1,4 para mulheres), insuficiência cardíaca congestiva (OR 4,5 para homens e 5,9 para mulheres) e doença valvar (OR 1,8 para homens e 3,4 para mulheres). Infarto do miocárdio é associado com aumento da FA em homens (OR 1,4).¹⁰

Em estudo de base populacional, 1.524 participantes (921 mulheres e 603 homens) com idade acima de 65 anos moradores de São Paulo, Brasil, foram submetidos a exame eletrocardiográfico em repouso, evidenciando uma prevalência de FA de 2,0% em mulheres e 3,2% em homens ($p=0,20$)¹³. Entretanto, faltam estudos brasileiros mais abrangentes para melhor avaliar a prevalência e o impacto da FA na morbi-mortalidade populacional.

1.1.2 Classificação Atual da Fibrilação Atrial

A atual classificação proposta pelas Diretrizes Brasileiras de Fibrilação Atrial², editadas pela Sociedade Brasileira de Cardiologia, baseia-se no aspecto temporal e pode ser: inicial, paroxística, persistente e permanente.

A inicial ou novo diagnóstico refere-se à primeira vez em que é feito o diagnóstico ou ao diagnóstico de novos episódios desta arritmia.

A paroxística é aquela que termina espontaneamente, sem ação de fármacos ou necessidade de cardioversão elétrica. Geralmente são episódios que duram menos de sete dias e frequentemente menos que 24 horas, podendo ou não apresentar recorrências.

A FA persistente é aquela que se instala e não se interrompe espontaneamente, a menos que seja realizada cardioversão elétrica ou com fármacos. Incluída nesta categoria, a FA com duração superior a um ano pode ser chamada de FA persistente de longa duração

A FA permanente (FAP) é aquela onde as tentativas de reversão ao ritmo sinusal falharam ou quando se faz a opção por não tentar a reversão da arritmia, por quaisquer meios.

1.1.3 Patogenia da Fibrilação Atrial

A fisiopatologia da FA baseia-se em reentradas intra-atriais múltiplas e contínuas, tendo seu principal determinante o comprimento de onda elétrica. Este é determinado pelo produto do período refratário e da velocidade de condução².

A gênese e manutenção da FA ainda é fonte de diversos estudos atuais da literatura, mas vários fatores são implicados e diversas áreas são apontadas como focos ectópicos de sua origem (disparadores ou *triggers*)¹⁴⁻¹⁶. Alterações no substrato miocárdico susceptível seriam os responsáveis pela manutenção do ritmo caótico^{4,15}. A fibrose - responsável pela heterogeneidade da condução - e a apoptose - que leva à substituição de miocardiócitos por fibroblastos - são as principais alterações histopatológicas encontradas^{1,5}.

Estudos com modelos animais também observaram que a condução lenta, redução do período refratário e maior tamanho atrial são todos associados a um aumento da perpetuação da FA¹⁷. Outros estudos também descreveram que em seres humanos a dilatação biatrial (considerando o volume), a hipertensão arterial sistêmica, a doença valvar, a redução da condução do átrio direito e a redução do período refratário global com aumento da heterogeneidade estão diretamente relacionadas com o substrato arritmogênico da FA^{1,17}.

Tan *et al*¹⁸ demonstraram que a presença de descontinuidades da musculatura cardíaca na junção entre as veias pulmonares e o átrio esquerdo pode promover atividade reentrante. Haïssaguerre *et al*¹⁹⁻²¹ demonstraram que as veias

pulmonares são a principal origem dos focos ectópicos deflagradores da fibrilação atrial em humanos. A ablação das bandas musculares no interior das veias pulmonares com radiofrequência ou seu isolamento empírico controla 70% dos pacientes com FA paroxística²². Entretanto, 20% a 30% dos pacientes continuam com recorrência de FA, possivelmente com origem fora das veias pulmonares²². A parede posterior do átrio esquerdo, a veia cava superior, a crista *terminalis* e o ligamento de Marshall podem também estar envolvidos neste processo.^{19,23-25}

Estudos anatômicos em corações humanos tentaram demonstrar alterações micromorfológicas e ultraestruturais na FA, entretanto apresentam pequeno número de casos, bem como a ausência de grupo controle sem FA²⁶. Assim, permanece incerto se as alterações encontradas, possivelmente decorrentes das doenças de base, guardam algum tipo de relação com a FA²⁷.

Finalmente, o fator primordial para que a FA se origine e se perpetue é a perda da homogeneidade elétrica e anatômica atrial. Com isso, alterações morfológicas tais como cardiopatias crônicas e aumento atrial, e ainda alterações eletrofisiológicas como presença de *triggers* e atividades reentrantes promovem a FA. Estes podem estar associados ou modulados por outros fatores a serem descritos a seguir, como o sistema nervoso autônomo e os receptores muscarínicos.

1.1.4 Fibrilação Atrial e Fibrose Miocárdica

A fibrose intersticial resulta do depósito de colágeno, decorrente de um processo de reparação, que substitui o miocárdio degenerado²⁸. Provoca remodelamento estrutural, que, juntamente com outras alterações ultraestruturais e da matriz extracelular, estão potencialmente envolvidos na patogênese da FA²⁷. As alterações incluem a miólise, hipertrofia celular, acúmulo de glicogênio, mudanças na cromatina e desdiferenciação celular. As modificações na matriz extracelular, além da fibrose e aumento de depósito do colágeno tipo I, envolvem aumento do TGF- β 1, fibrilina e receptor da angiotensina II (subtipo I)²⁷.

A fibrose intersticial provoca atraso na condução atrial e conseqüentemente pode fazer com que um impulso elétrico se propague através de vias alternativas que já tenham recuperado sua excitabilidade, provocando reativação. Isto pode aumentar o número de circuitos de reentrada²⁹.

Dentre os primeiros artigos que descreveram associação entre fibrilação atrial, degeneração celular e fibrose, está um trabalho observacional de amostras atriais cirúrgicas de 14 pacientes portadores de doença valvular mitral³⁰. Neste mesmo estudo, os autores descrevem que a própria fibrilação atrial e sua contração descoordenada poderia piorar a degeneração do músculo atrial; conceito que ainda permeia como dúvidas entre causa e efeito em estudiosos no assunto.

A FA é multicausal, e o remodelamento estrutural permanece com importante contribuição na sua perpetuação. Com isso, a fibrose atrial

aparentemente segue o desenvolvimento da arritmia e ainda permanece sem esclarecimento o fato de alterações estruturais preexistentes serem responsáveis pela iniciação da FA. Desta forma, é possível que doenças cardíacas subjacentes delineiem alterações teciduais que favoreçam esta arritmia sob efeito do remodelamento elétrico, focos disparadores (*triggers*) ou alterações autonômicas²⁷.

1.2 SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO CARDÍACO INTRÍNSECO

1.2.1 Anatomia Fisiológica do Sistema Nervoso Autônomo

As fibras nervosas são formadas pelos prolongamentos dos neurônios (dendritos ou axônios) e seus envoltórios. É envolvida por uma camada conjuntiva denominada *endoneuro*. As fibras nervosas organizam-se em feixes e cada feixe é envolvido por uma bainha conjuntiva denominada *perineuro*. Vários feixes agrupados paralelamente formam um *nervo*. O nervo também é envolvido por uma bainha de tecido conjuntivo chamada *epineuro*. Tanto a bainha de mielina, quanto as células de Schwann (envolvem os axônios dos neurônios e produzem mielina) são coradas para proteína S-100 pela técnica de imuno-histoquímica, porém os axônios não têm esta propriedade.³¹

O sistema nervoso autônomo (SNA) é dividido didaticamente em simpático e parassimpático.

As fibras nervosas do SNA fazem sinapse num gânglio (aglomerado de corpos neuronais fora do sistema nervoso central) antes de atingirem o órgão-alvo, sendo assim chamadas de fibras pré-ganglionares e fibras pós-ganglionares. As fibras pré-ganglionares do SNA liberam o neurotransmissor acetilcolina no gânglio autônomo e são chamadas de fibras colinérgicas. As fibras pós-ganglionares parassimpáticas são também colinérgicas, entretanto as fibras pós-ganglionares

simpáticas podem ser tanto colinérgicas como adrenérgicas (liberam o neurotransmissor adrenalina), sendo estas últimas a grande maioria.³²

O SNA simpático apresenta os corpos neuronais das chamadas fibras simpáticas na medula espinhal e sua porção tóraco-lombar. Estas fibras fazem sinapses com gânglios simpáticos paravertebrais ou ainda com os dois gânglios pré-vertebrais (celíaco e hipogástrico) e então seguem para inervar o órgão-alvo. No coração, as fibras simpáticas são originárias dos segmentos vertebrais de T3 a T6.³²

. O SNA parassimpático possui fibras pré-ganglionares longas que emergem do encéfalo ou dos segmentos sacrais. As fibras pré-ganglionares do SNA parassimpático seguem até o órgão-alvo, encontrando gânglios bastante próximos ao órgão, e ali fazem sinapse com a fibra pós-ganglionar. As fibras pós-ganglionares inervam a própria estrutura do órgão. No coração, as fibras parassimpáticas são provenientes do par X (vago).³²

1.2.2 Sistema Nervoso Autônomo Cardíaco Intrínseco

O sistema nervoso autônomo (SNA) cardíaco intrínseco é uma rede neural composta de neurônios, fibras nervosas, nervos e plexos ganglionares (PG), simpáticos e parassimpáticos, encontrados no coração e nas grandes veias adjacentes³³. É distribuído na gordura epicárdica atrial e ventricular, primariamente localizado na superfície atrial posterior e adjacente à origem da aorta e artéria pulmonar³³.

Os PG são pontos de convergência tipicamente encontrados em concentrações de gordura epicárdica conhecidos como *fat-pads* (FP). Os FP descritos no coração humano estão localizados na junção da veia pulmonar superior esquerda-átrio (PG atrial esquerdo superior), na junção da veia pulmonar superior direita-nó sinoatrial (PG atrial direito posterior) e na junção da veia cava inferior-átrios (atrial esquerdo postero-medial)^{20,21}. Outros PG também são descritos: atrial direito superior, atrial direito posterior, atrial esquerdo póstero-lateral, aórtico direito, aórtico esquerdo, aórtico posterior, aórtico anterior, descendente anterior, descendente posterior, marginal direito agudo e marginal obtuso³³ (Figuras 1 e 2).

Armour *et al*³³ estudaram a anatomia do sistema nervoso cardíaco intrínseco parassimpático (colinérgico), estimando a presença de mais de 14.000 neurônios distribuídos em aproximadamente 554 gânglios. A função de todos esses neurônios ainda é incerta, mas algumas evidências indicam que parte deles são vias aferentes as quais podem estar envolvidos na regulação cardíaca. A origem da inervação cardíaca simpática (adrenérgica) ainda não está definitivamente descrita, mas estudos apontam que pode estar entre T1 e T4, com 5.000 neurônios por cada segmento³³.

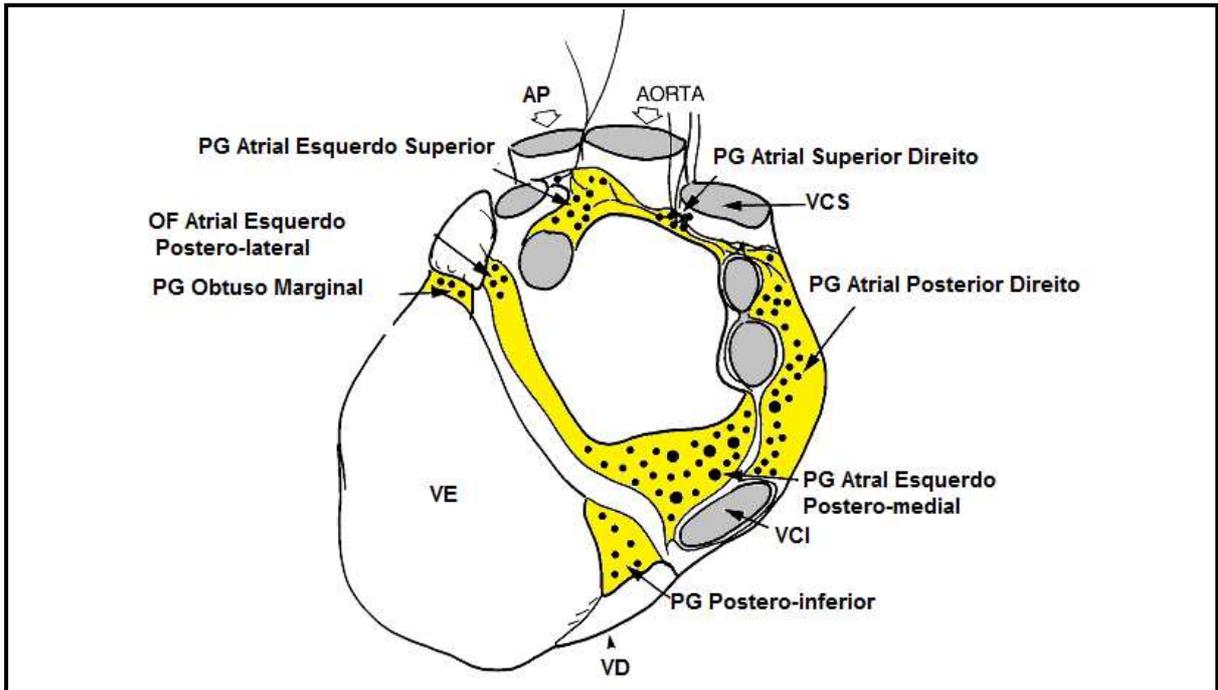


Figura 1 – Desenho do aspecto posterior de um coração humano e os plexos ganglionares (amarelo). VCI: veia cava inferior, VCS: veia cava superior, VE: ventrículo esquerdo, VD: ventrículo direito. Adaptado de Armour *et al*⁸³.

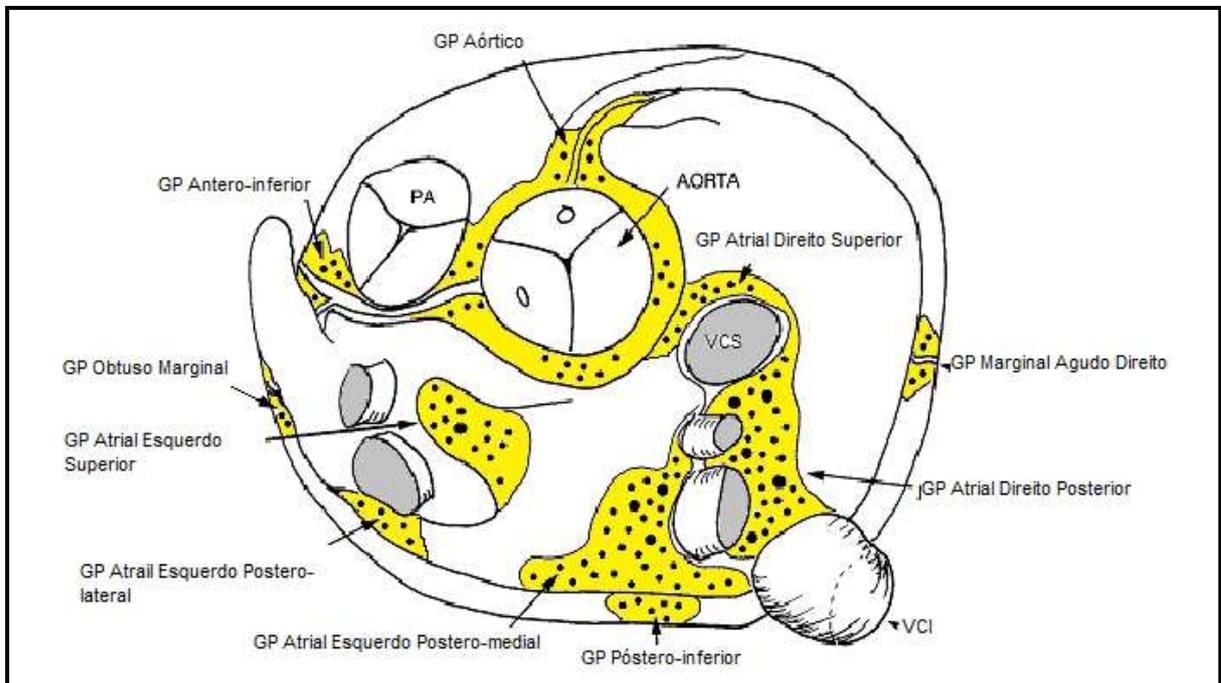


Figura 2.- Desenho do aspecto superior do coração humano e os plexos ganglionares (amarelo). VCI: veia cava inferior, VCS: veia cava superior, VE: ventrículo esquerdo, VD: ventrículo direito. Adaptado de Armour *et al*⁸³.

1.2.3 Sistema Nervoso Autônomo e Fibrilação Atrial

O SNA é de importante papel fisiopatológico no desenvolvimento da FA²⁰. Recentemente, verificou-se que a estimulação do SNA cardíaco intrínseco por eletricidade ou por injeção de parassimpatomiméticos nos PG pode ter importante papel na dinâmica de iniciação e manutenção da FA³⁴. Diversos estudos têm demonstrado que uma alteração do balanço entre a função simpática e parassimpática do SNA está envolvida na iniciação da FA e não somente uma ativação de uma ou outra via³⁵⁻³⁷. Sharifov *et al* demonstraram que a administração de acetilcolina e catecolaminas na artéria do nó sinoatrial causa FA espontânea originada da própria área sinoatrial³⁸.

Dados recentes demonstraram que a eliminação de nervos autonômicos em ablações por cateter em veias pulmonares pode aumentar o índice de sucesso do procedimento, sugerindo um importante papel da inervação autonômica na fisiopatologia da fibrilação atrial paroxística^{18,21,33,37,38}. Estes dados sugerem que as áreas circunvizinhas das veias pulmonares são importantes vias de inervação pós-ganglionares para o átrio esquerdo e que podem estar ligados às ativações simpáticas e vagais da FA^{35,36}.

Diversos estudos sugerem uma modulação autonômica na FA. A descarga colinérgica é importante fator nas arritmias supraventriculares contribuindo para iniciação e perpetuação da FA. Em outros estudos, a ativação do nervo vago determina a redução do período refratário e o aumento da dispersão da refratariedade^{35,37}. Po *et al*⁴⁰ demonstraram que o remodelamento autonômico

causado pela hiperatividade do SNA cardíaco intrínseco pode explicar despolarizações prematuras espontâneas e o início e manutenção da FA.

Hopkins *et al*⁴¹ descreveram degenerações dos PG em amostras de FP retiradas de pacientes submetidos a revascularização do miocárdio. Entretanto, as alterações patológicas do sistema nervoso cardíaco intrínseco e na isquemia miocárdica ainda necessitam de mais estudos.

1.2.4 Sistema Nervoso Autônomo e Veia Oblíqua do Átrio Esquerdo

O ligamento de Marshall, descrito como uma dobra vestigial de pericárdio, envolve a veia oblíqua do átrio esquerdo (VoAe), também chamada de veia de Marshall. Doshi *et al*²⁵ mostraram que o ligamento de Marshall, em corações caninos, é rico em inervação simpática sensível a catecolaminas e que esta estrutura pode estar relacionada com a taquiarritmia atrial adrenérgica¹⁹. Estes achados sugerem que esta estrutura pode ser foco de batimentos ectópicos deflagradores de FA^{24,25}. Em estudo recente, Ulphani *et al*⁴² descreveram que este ligamento é rico em fibras nervosas colinérgicas em cães, o que pode ser implicado na gênese e perpetuação da FA. Makino *et al*⁴³ descreveram aumento de fibras nervosas simpáticas e gânglios parassimpáticos nessa região em um estudo morfológico de 28 corações humanos.

1.3 RECEPTORES MUSCARÍNICOS

1.3.1 Fisiologia dos Receptores Muscarínicos

A estimulação dos neurônios parassimpáticos pós-ganglionares libera acetilcolina (colinérgicos) que age nos receptores muscarínicos da membrana celular nos órgãos-alvo (no caso do coração, nos miócitos). Cinco subtipos foram descritos por Bonner *et al* em 1989⁴⁴. Classificados como receptores muscarínicos subtipos 1, 2, 3, 4 e 5⁴⁵; os receptores M2 e M4 agem através da inibição da adenil-ciclase, sendo o primeiro predominantemente encontrado no miocárdio^{44,45}. Os receptores M1, M3 e M5 agem através da estimulação da fosfolipase C^{45,46}.

Inicialmente foi descrito que o mecanismo de ação dos receptores muscarínicos se dava através do fechamento dos canais de cálcio e aumento da hiperpolarização da membrana, refletindo em cronotropismo e inotropismo negativos. Entretanto, estudos sugerem que os efeitos contrários do M1, tais como hipertensão, taquicardia, se dêem através da liberação de catecolaminas nas terminações nervosas simpáticas, tendo efeito estimulatório catecolamina-dependente⁴⁴. Também foi demonstrado que os receptores M1, M2 e M4 são expressos nos gânglios simpáticos⁴⁴.

Os receptores M1 são encontrados especialmente no cérebro (córtex e hipocampo), glândulas exócrinas, epitélio do epidídimo e gânglios simpáticos e possuem dentre seus efeitos funcionais a broncoconstrição e secreção de glândulas

salivares. Os M2 são principalmente descritos no coração, rombencéfalo, músculo liso e canais de potássio. Fisiologicamente, os receptores M2 determinam inotropismo e cronotropismo negativos, bem como inibem os canais de cálcio e reduzem a liberação pré-sináptica de neurotransmissores. Os receptores M3 são comumente encontrados no músculo liso, glândulas e cérebro e determinam a secreção glandular e reduzem a liberação pré-sináptica de neurotransmissores. Os receptores M4 são descritos em maior concentração no prosencéfalo e no núcleo estriado e inibem os canais de cálcio. Os receptores M5 são descritos nas células endoteliais e substância *nigra* e não ainda possuem resposta funcional descrita.⁴⁵

A expressão dos diversos subtipos dos receptores muscarínicos (M1 a M5) no coração humano foi descrita por Wang *et al*⁴⁷ em um estudo descritivo de amostras atriais direitas de quatro pacientes submetidos a cirurgia de revascularização miocárdica, demonstrando a presença de todos os subtipos no coração humano, incluindo receptores M5.

1.3.2 Receptores Muscarínicos e Fibrilação Atrial

Em modelo experimental, Soares *et al*⁴⁸ descreveram o aumento da concentração dos receptores muscarínicos após a denervação sinoaórtica, levando a hiperresponsividade à estimulação por acetilcolina. Shi *et al*⁴⁶ demonstraram que em átrios com FA em corações caninos portadores de insuficiência cardíaca, as densidades dos receptores M2 e M4 estão reduzidas e dos receptores M3 estão

aumentados quando comparados aos átrios sem FA. Estas alterações foram encontradas juntamente com as concentrações dos canais de potássio referentes a cada receptor.

Embora suas ações possam estar diretamente relacionadas com a fisiopatologia da FA, a literatura carece de trabalhos em corações humanos relacionados a esta arritmia.

1.4 OBJETIVOS

Descrever e analisar em seres humanos a relação entre FAP e possíveis alterações anatômicas e micromorfológicas do coração, do sistema nervoso autônomo cardíaco intrínseco e da expressão dos diversos subtipos de receptores muscarínicos miocárdicos.

1.4.1 Objetivos Específicos:

1. Descrever as possíveis alterações da anatomia macroscópica do seio coronariano e da veia oblíqua do átrio esquerdo (drenagem venosa do átrio esquerdo) relacionadas à FAP.
2. Quantificar e comparar o percentual de fibrose intersticial em corações com e sem FAP.
3. Quantificar e caracterizar a inervação simpática e parassimpática no coração humano alterado, com e sem FAP, bem como identificar possíveis alterações do SNA cardíaco intrínseco.

4. Quantificar e caracterizar a presença de possíveis alterações na expressão dos diversos receptores muscarínicos no miocárdio atrial humano e sua relação com a FAP.

2. Material e Métodos

2.1 DEFINIÇÃO E DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo retrospectivo, observacional, analítico e transversal, realizado em corações humanos, com o intuito de descrever e analisar a relação da FAP e possíveis alterações anatômicas e micromorfológicas do coração, do sistema nervoso autônomo cardíaco intrínseco e dos receptores muscarínicos do miocárdio atrial.

2.2 CASUÍSTICA

Foram estudados ao total vinte e seis corações de cadáveres humanos, procedentes de necrópsias realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor/FMUSP).

A seleção dos casos foi realizada retrospectivamente, em ordem inversa no tempo, que obedeceram aos critérios de inclusão e não apresentaram um dos critérios de exclusão (abaixo). Este processo visa obter casos mais recentes, com melhor estado de preservação das peças. Estas estavam armazenadas em solução de formol a 10% e identificadas pelo número da autópsia.

Com o objetivo de reduzir os vícios de seleção e aumentar o poder do estudo de detectar alterações exclusivamente envolvidas na FA, os corações foram divididos em dois grupos. No Grupo I foram selecionados corações de indivíduos portadores de FAP documentada e cardiopatia crônica e o Grupo II de indivíduos que não portavam qualquer taquiarritmia supraventricular, pareados com o grupo I em etiologia da cardiopatia. Foram utilizados mais de um tipo de cardiopatia com o objetivo de aumentar o número de corações envolvidos no estudo, bem como avaliar a presença das possíveis alterações a serem encontradas, considerando as diversas cardiopatias estruturais selecionadas. Para tal, foram revistos os prontuários eletrônico (Sistema S13), digitalizado e escrito dos pacientes, bem como a descrição do laudo de necrópsia e definida a FA permanente como descrição com duração acima de dois anos antes do óbito do paciente.

Foram definidas como cardiopatias estruturais as cardiopatias crônicas conforme classificação da II Diretriz Brasileira de Cardiopatia Grave:⁴⁹ cardiopatias isquêmica, congênita e hipertensiva, miocardiopatias dilatadas primária (idiopática) ou secundária (valvar, alcoólica, etc.), restritiva, chagásica e hipertrófica e cor pulmonale crônico.

2.2.1 Critérios de Inclusão:

Grupo I:

- Corações de cadáveres humanos, acima de 18 anos, portadores de FA permanente descrita e documentada em prontuário, sendo realizada revisão retrospectiva com base no prontuário eletrônico ou escrito.
- Corações com menos de cinco anos de preservação em formol a 10%.

Grupo II:

- Corações de cadáveres humanos, acima de 18 anos, sem história de fibrilação atrial permanente ou qualquer taquiarritmia supraventricular descrita, obtidos em necrópsias realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica do Incor/HCFMUSP. A história

prévia foi pesquisada com base no prontuário eletrônico ou escrito e descrição do laudo de necrópsia.

- Cardiopatias pareadas com o Grupo I.
- Peças com menos de 5 anos de preservação em formol a 10%.

2.2.2 Critérios de Exclusão:

- Pacientes submetidos a procedimentos que promovam alterações estruturais no coração que prejudiquem sua avaliação.
- Cardiopatias congênitas.
- Corações com cortes que prejudiquem a análise adequada da peça.

2.2.3 Sumário da Seleção dos Casos

Durante o período compreendido entre os anos de 2002 e 2008, foram realizadas 1244 autópsias no Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Destas, 112 casos tinham fibrilação atrial permanente documentada (9%), sendo excluídos 90 por preencherem os critérios de exclusão ou não preencherem os critérios de

inclusão descritos anteriormente. Vinte e dois casos foram estudados, sendo dois excluídos por inconsistência dos dados entre prontuário e relatório de autópsia quanto ao tempo de FA e dois outros casos por problemas técnicos dos cortes realizados. Outros cinco casos foram excluídos pelo pareamento das doenças entre portadores e não portadores da arritmia, totalizando ao final 13 casos estudados com FAP, conforme descrito na figura 3.

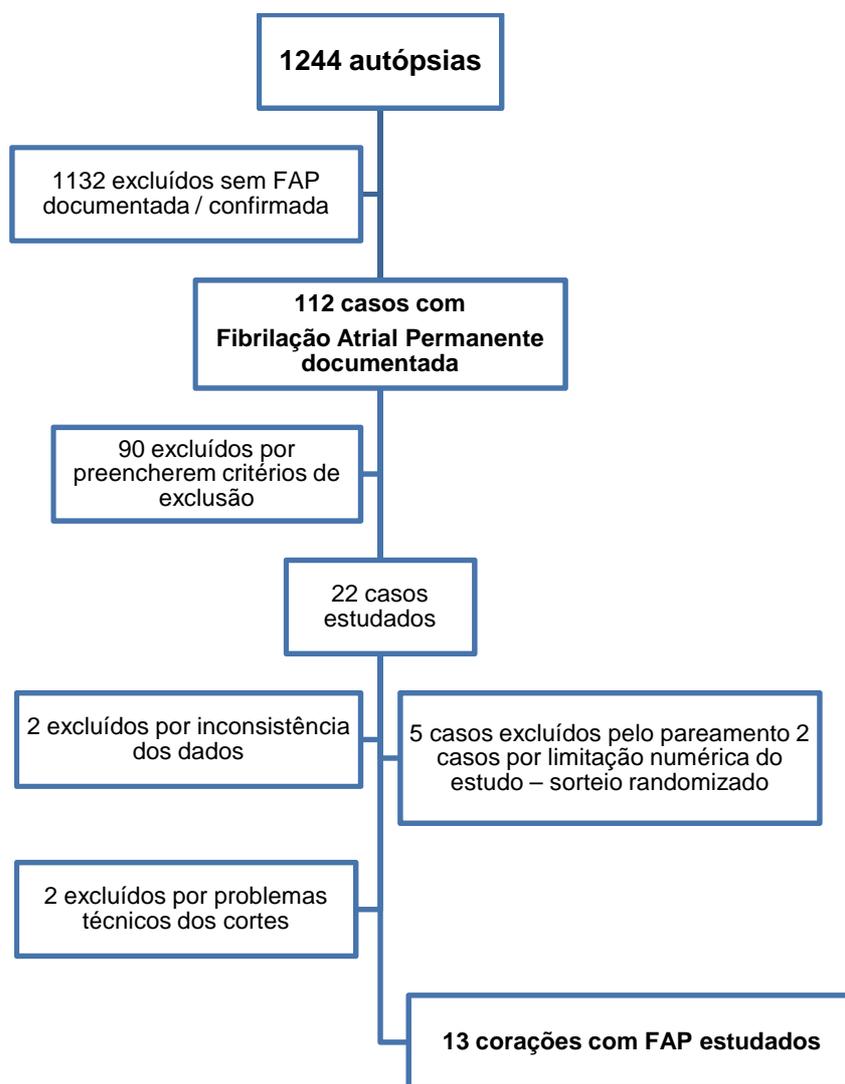


Figura 3: Representação esquemática e resumida da seleção dos casos estudados.

As descrições dos casos excluídos por pareamento, problema técnico dos cortes e limitação numérica do estudo encontram-se na Tabela 2.1, seguindo as observações de sexo, idade e cardiopatia. Os casos excluídos por inconsistência dos dados foram suprimidos.

Tabela 2.1: Descrição dos casos excluídos por pareamento, problema técnico dos cortes e limitação numérica

Cardiopatia/Miocardopatia	Sexo	Idade	Motivo
Isquêmica	F	70	Limitação Numérica
Cor pulmonale crônico	F	81	Limitação Numérica
Dilatada Valvar	M	72	Pareamento
Dilatada Valvar	F	72	Pareamento
Dilatada Primária	M	30	Pareamento
Dilatada Primária	F	60	Pareamento
Dilatada Valvar	F	75	Problema técnico dos cortes
Hipertensiva	F	89	Problema técnico dos cortes
Hipertrófica	M	41	Pareamento

F: feminino; M masculino; idade em anos

2.3 DADOS DOS PACIENTES

Durante a revisão dos prontuários dos pacientes, bem como da ficha de necrópsia, foram compiladas as variáveis clínicas e ecocardiográficas que pudessem interferir na fisiopatologia da fibrilação atrial, conforme ficha do coração no anexo I, a seguir:

2.3.1 Variáveis Clínicas:

- Idade, em anos.
- Sexo.
- Altura do paciente no momento da realização do ecocardiograma analisado, em metros.
- Peso do paciente no momento da realização do ecocardiograma analisado, em quilogramas.
- Diagnóstico de diabetes *mellitus* (“sim” ou “não”) ou hipertensão arterial sistêmica (“sim” ou “não”).
- Etiologia da cardiopatia crônica subjacente.

2.3.2 Variáveis Ecocardiográficas:

- Espessura do septo interventricular, em milímetros;
- Fração de Ejeção (percentagem de 0 a 100).

- Diâmetro do átrio esquerdo, em milímetros;

2.3.3 Dados Demográficos, Clínicos e Ecocardiográficos da Amostra

As características demográficas, clínicas e ecocardiográficas dos pacientes de ambos os grupos estão demonstradas comparativamente na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Comparações entre os grupos em relação às características demográficas e clínicas dos pacientes

Variáveis	Grupo		p-valor
	I (com FAP) (n=13)	II (sem FAP) (n=13)	
Sexo – n (%)			
Masculino	5 (38,5)	8 (61,5)	0,239
Feminino	8 (61,5)	5 (38,5)	
Idade (anos) – média (dp)	67,5 (15,4)	65,5 (11,4)	0,710
Etiologia – n (%)			
Isquêmica	4 (30,8)	4 (30,8)	-
Crônica/IAM prévio	3	2	
Aguda	1	2	
Dilatada Valvar	4 (30,8)	4 (30,8)	
Reumática mitral	2	1	
Insuficiência mitral	1	2	
Estenose/Insuficiência aórtica	1	1	
Hipertensiva	2 (15,4)	2 (15,4)	
Dilatada Primária	2 (15,4)	2 (15,4)	
Chagásica	1 (7,7)	1 (7,7)	
Peso (kg)	66,5 (14,1)	63,8 (15,0)	0,673
Altura (m)	162,4 (14,7)	160,8 (8,8)	0,780
IMC (kg/m ²) – média (dp)	25,0 (2,9)	24,5 (4,2)	0,738

Tabela 2.2: Comparações entre os grupos em relação às características demográficas e clínicas dos pacientes (continuação)

Diabetes <i>Mellitus</i> – n (%)	3 (23,1)	3 (25,0) (n=12)	>0,999
Hipertensão Arterial Sistêmica – n (%)	9 (69,2)	4 (33,3) (n=12)	0,073**
Volume do átrio esquerdo*** (cm ³) - média (dp)	83,2 (38,4)	47,9 (40,8)	0,033**
Espessura do septo ventricular*** (mm) - média (dp)	10,3 (2,4)	10,4 (1,6)	0,94
Fração de ejeção*** – média (dp)	49,8 (20,1)	46,1 (19,8)	0,666

dp=desvio padrão; * 1 paciente sem informação (porcentagem em relação a 12 pacientes); *** medida pelo ecocardiograma.

2.4 FASE MACROANATÔMICA

Para o completo estudo morfológico dos corações, após a seleção de cada peça através de uma rigorosa inspeção, deu-se seguimento a dissecação anatômica.

2.4.1 Drenagem Venosa do Átrio Esquerdo:

Foi analisada a drenagem venosa da parede posterior do átrio esquerdo para o estudo das relações anatômicas da VoAe. Para isso, foi primeiramente identificado o óstio do seio coronário (OSC) e medido o seu diâmetro através de inserção de uma bugia de diâmetro adequado, sendo seccionada longitudinalmente a parede livre do seio coronário com exposição dos óstios de suas tributárias. Foram identificadas e caracterizadas as válvulas de Vieusseuns, medindo através de paquímetro universal sua distância com o OSC e observando a quantidade de cúspides. Após identificar o óstio da VoAe, foi introduzido um guia metálico milimetrado no óstio da VoAe para determinação do seu diâmetro, bem como sua progressão pela parede do átrio esquerdo macroscopicamente, estabelecendo o seu trajeto (Figura 4).

- Distância entre o OSC e a VoAe, em milímetros
- Diâmetro do óstio da VoAe, em milímetros

- Diâmetro do OSC, em milímetros
- Distância entre a válvula de Vieussens e OSC, em milímetros

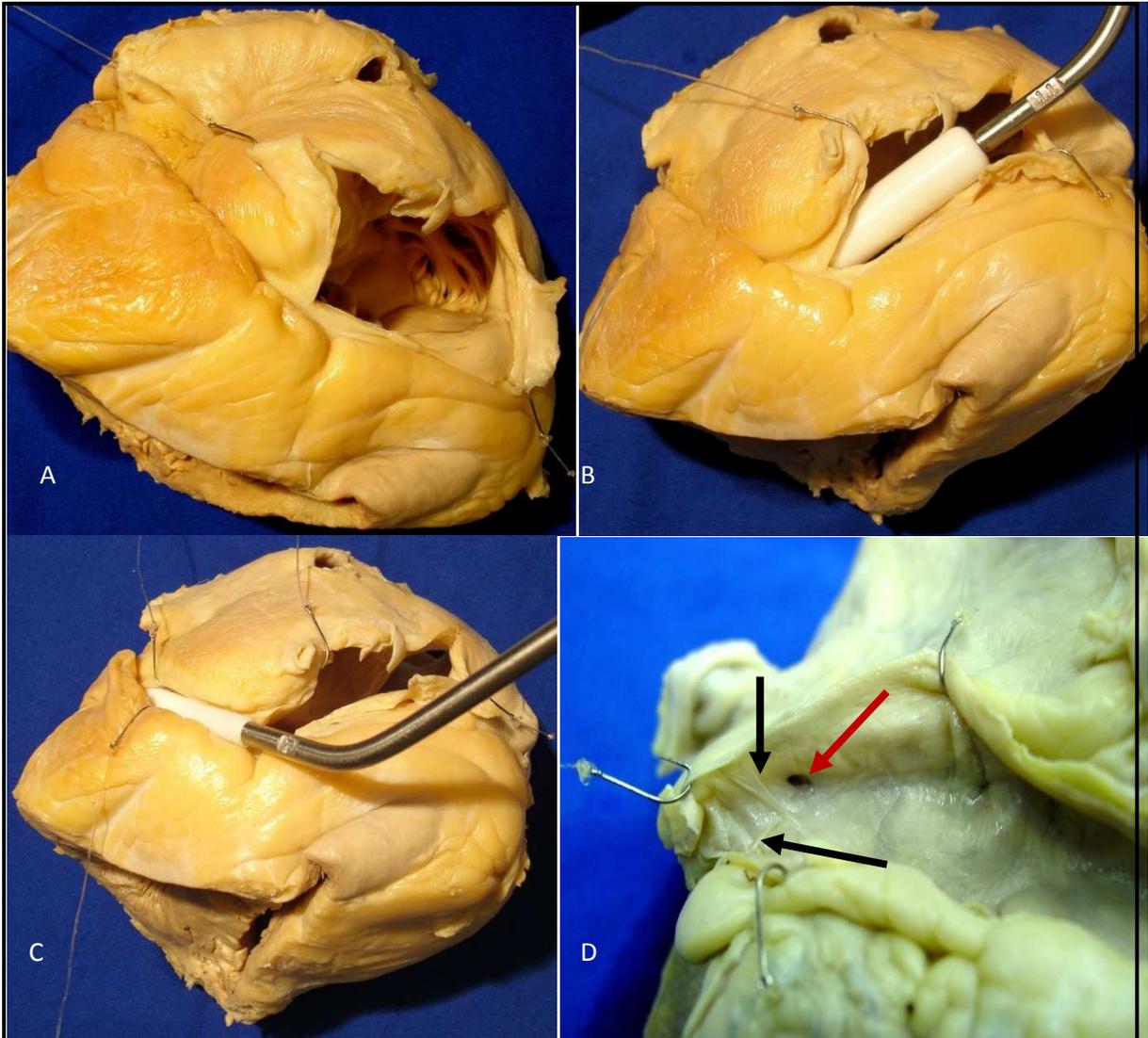


Figura 4 – Detalhes dos cortes anatômicos da drenagem venosa da parede atrial esquerda posterior. A - identificado o óstio do seio coronário (OSC). B - medido o seu diâmetro através de inserção de uma bugia de diâmetro adequado. C - seccionada longitudinalmente a parede livre do seio coronário com exposição dos óstios de suas tributárias. D – identificação do óstio da VoAe (seta vermelha) e válvulas de Vieusseus e observada a quantidade de cúspides (setas pretas).

2.4.2 Átrio esquerdo, septo ventricular e *Fat-pads*

Também foram determinados os diâmetros do átrio esquerdo e seu volume calculado, tendo como medida transversal a maior distância entre o septo atrial e o início da aurícula esquerda e como medida sagital a maior distância entre o assoalho e a parede posterior atrial. O septo ventricular foi mensurado em sua espessura na porção medial, sendo considerado como normal a espessura de $17\pm 2\text{mm}$ para homens e $13\pm 2\text{mm}$ para mulheres⁵⁰.

Foram identificados os *fat-pads* (FP) atrial esquerdo superior (FP1), atrial direito posterior (FP2) e atrial esquerdo póstero-medial (FP3) no epicárdio, individualizando sua estrutura e registrando seu diâmetro no epicárdio no anexo I, com o objetivo de observar uma possível alteração em suas dimensões em corações com FAP.

2.4.3 Cortes Anatômicos:

Para análise microanatômica, foram ressecadas 9 amostras teciduais, em 3 setores principais: átrios, *fat-pads* e ventrículo.

Cinco cortes atriais transmuralis, abrangendo o epicárdio, miocárdio e endocárdio em sua completa extensão, sendo dois no átrio direito, na parede posterior (AD1) e no istmo cavo-tricuspidéu, próximo ao óstio do seio coronário

(AD2) e três no átrio esquerdo, no trajeto médio da VoAe (AE1), na junção da veia pulmonar superior esquerda (AE2) e na aurícula (AE3).

Outros três cortes transmurais em FP epicárdicos, sendo no atrial esquerdo superior (FP 1), atrial direito posterior (FP 2) e no atrial esquerdo pósteromedial (FP 3). Como controle das alterações estruturais, foi seccionada uma amostra da porção medial septo ventricular (SIV).

2.5 FASE MICROANATÔMICA

Nesta fase, foram analisadas as possíveis alterações histopatológicas. As lâminas foram estudadas sem que o observador tivesse conhecimento de que grupo ou caso estava sendo realizado, bem como das características dos pacientes. Foi utilizada histomorfometria computadorizada através do sistema de análise de imagens *Axiovision 4.6* (Carl Zeiss, Alemanha), acoplado a microscópio *Axio imager A1* da mesma marca.

2.5.1 Processamento Histológico

Após processamento histológico habitual com embebição em parafina, cortes sucessivos de 4 micrômetros de espessura das amostras teciduais foram corados pelo método do tricrômio de Masson e submetidos a reações de imunohistoquímica, conforme será descrito adiante, para análise da inervação do sistema nervoso autônomo intrínseco cardíaco e dos receptores muscarínicos presentes no miocárdio.

Todos os nove cortes de todos os corações foram analisados por esta técnica. Qualquer corte que tenha apresentado problemas em sua análise arquitetural foi descartado e na impossibilidade de ter sido realizado um novo do mesmo coração, este foi considerado nulo.

2.5.2 Técnica de imuno-histoquímica

Das amostras teciduais previamente parafinadas em blocos foram realizados os cortes de 4 micrômetros e processados pela técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase para os diversos anticorpos descritos a seguir.

- Desparafinização em estufa.
- Desparafinização em xilol.
- Reidratação em álcool absoluto, em álcool a 95%, em álcool a 70%, lavagem em água corrente e em água deionizada.
- Recuperação antigênica com solução Tris citrato, pH 7,2, em panela de pressão por 1 minuto.
- Bloqueio da peroxidase endógena com uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), 10 volumes, por três ciclos de 4 minutos, seguida por lavagem em água corrente.
- Bloqueio de reação inespecífica através de banho de caseína 2,5% em cloreto de sódio por 5 minutos.
- Incubação em câmara úmida em geladeira com os anticorpos primários nas diluições descritas a seguir, durante a noite (18 a 20 horas).
- Lavagem em tampão.
- Incubação em câmara úmida com o anticorpo secundário polímero HRP SuperPicture (*Invitrogen*, EUA), em temperatura de 37°C, por 30 minutos.
- Lavagem em tampão.

- Incubação em solução de cromógeno. Esperar revelação por 5 minutos.
- Lavagem em água corrente por 10 minutos.
- Contracoloração com hematoxilina de Harris.
- Lavagem em água corrente por 5 minutos.
- Montagem das lâminas.

2.5.3 Análise Estrutural das Fibras Miocárdicas

Cada corte corado em tricômio de Masson foi sistematicamente examinado para se identificar características estruturais associadas a potencial reentrante, a saber:

- Desconexões / Interrupções entre segmentos musculares (variável categorizada em “sim” ou “não”)
- Mudanças abruptas, acima de 90°, do trajeto das fibras musculares (variável categorizada em “sim” ou “não”)
- Presença de deflexões pericárdicas (variável categorizada em “sim” ou “não”)
- Cruzamentos complexos de fibras musculares que microscopicamente possam ser substrato de reentrância (variável categorizada em “sim” ou “não”)

Na figura 5, são demonstradas exemplos de presença de fibras miocárdicas desconexas.

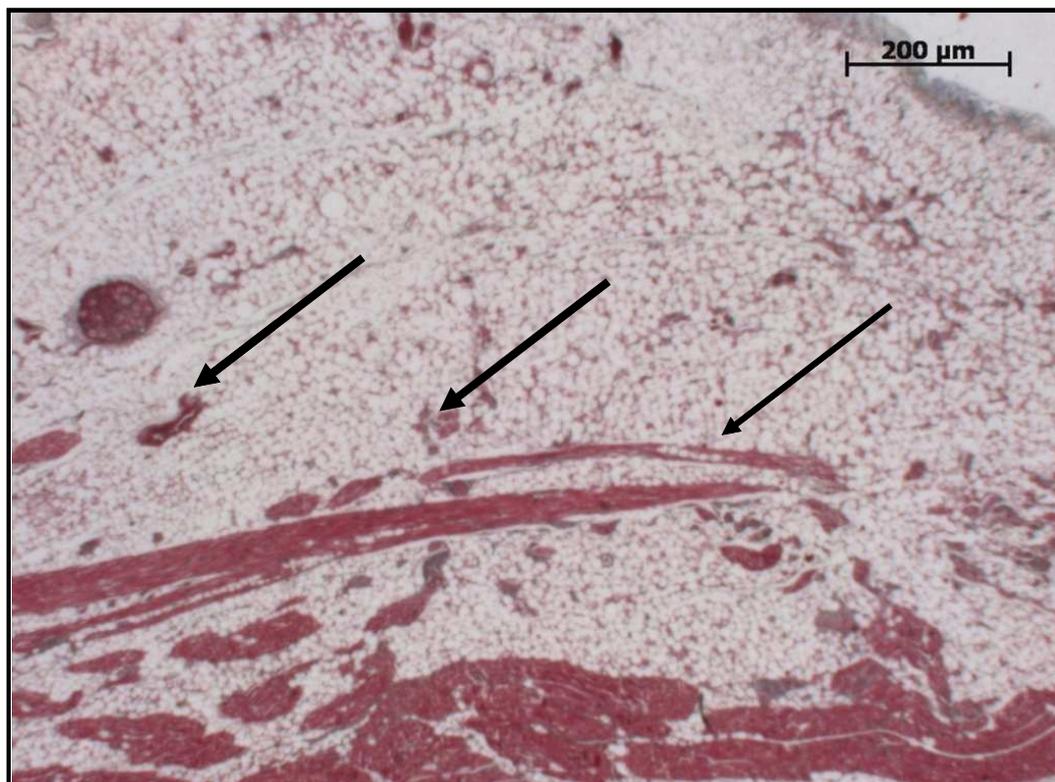


Figura 5: Corte do tecido do *fat-pad* atrial direito posterior corado pelo Masson. Exemplo de fibras desconexas (setas). Aumento da objetiva 5x.

Os dados acima, categorizados em “sim” ou “não”, foram analisados em percentagem de cortes com a presença da alteração em cada coração. Desta forma, foi obtida uma variável contínua de 0 a 1.

- Espessura da parede endocárdica, miocárdica e epicárdica médias, obtida através da análise de duas medidas realizadas na interseção

dos três terços do corte histológico na lâmina estudada (variável contínua entre 0 e infinito)

2.5.4 Análise da Fibrose Miocárdica

Com o objetivo de avaliar o grau de fibrose tecidual nos diversos cortes analisados, foi determinado o percentual de área do tecido analisado positivo para colágeno à coloração pelo método de Masson em cada campo (variável contínua percentual entre 0 e 100). A mensuração foi feita através de detecção automática de cores de área positiva para colágeno (azul) sobre área miocárdica total, em micrômetros quadrados, pelo sistema de análise de imagens *Axiovision 4.6* (Carl Zeiss, Alemanha), acoplado a microscópio *Axio imager A1* da mesma marca.

Com o objetivo de analisar a consistência entre os diversos segmentos do coração, foi realizada uma subanálise dos cortes supraventriculares (todos, exceto o septo ventricular: AD1, AD2, AE1, AE2, AE3, FP1, FP2 e FP3) e dos cinco cortes atriais separadamente (AD1, AD2, AE1, AE2, AE3).

Os cortes histológicos que apresentaram mais de dois centímetros de extensão foram analisados até o segundo centímetro, tendo como ponto inicial a etiqueta fosca da lâmina. No corte do átrio esquerdo no trajeto médio da VoAe, a área analisada foram os dois centímetros do corte que centralizem esta estrutura, quando visualizada.

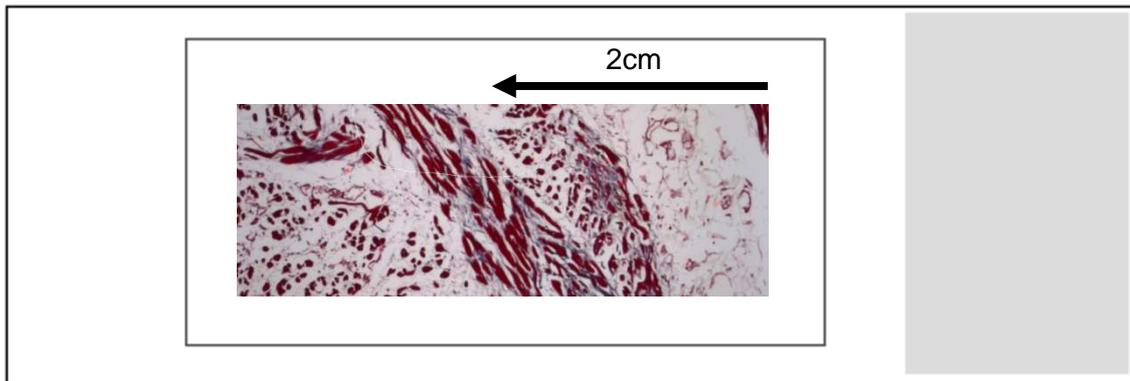


Figura 6: Desenho esquemático do método utilizado na leitura das lâminas na análise estrutural.

2.5.5 Sistema Nervoso Autônomo Cardíaco Intrínseco

Todos os cortes determinados foram submetidos à reação de imunohistoquímica através da técnica da imunoperoxidase para tirosina-hidroxilase (TH) (Anti-Tyrosine Hydroxylase, clone LNC1 – MAB318 *Chemicon*, EUA) para detecção das fibras simpáticas pós-ganglionares (adrenérgicas) e S-100 (Z0311 *Dakocytomation*, A/S, Dinamarca) para detecção de todas as fibras nervosas (bainha de mielina e células de Schwann) do SNA.

Para tal, os cortes histológicos foram incubados com os respectivos anticorpos em diluição de 1:54 para TH e 1:300 para S-100, seguindo o processo já descrito anteriormente.

A contagem das fibras nervosas foi determinada através da utilização de histomorfometria computadorizada nos cortes histológicos, bem como o tamanho em

área de cada fibra identificada com tirosina-hidroxilase (TH) e S-100, comparando os grupos envolvidos.

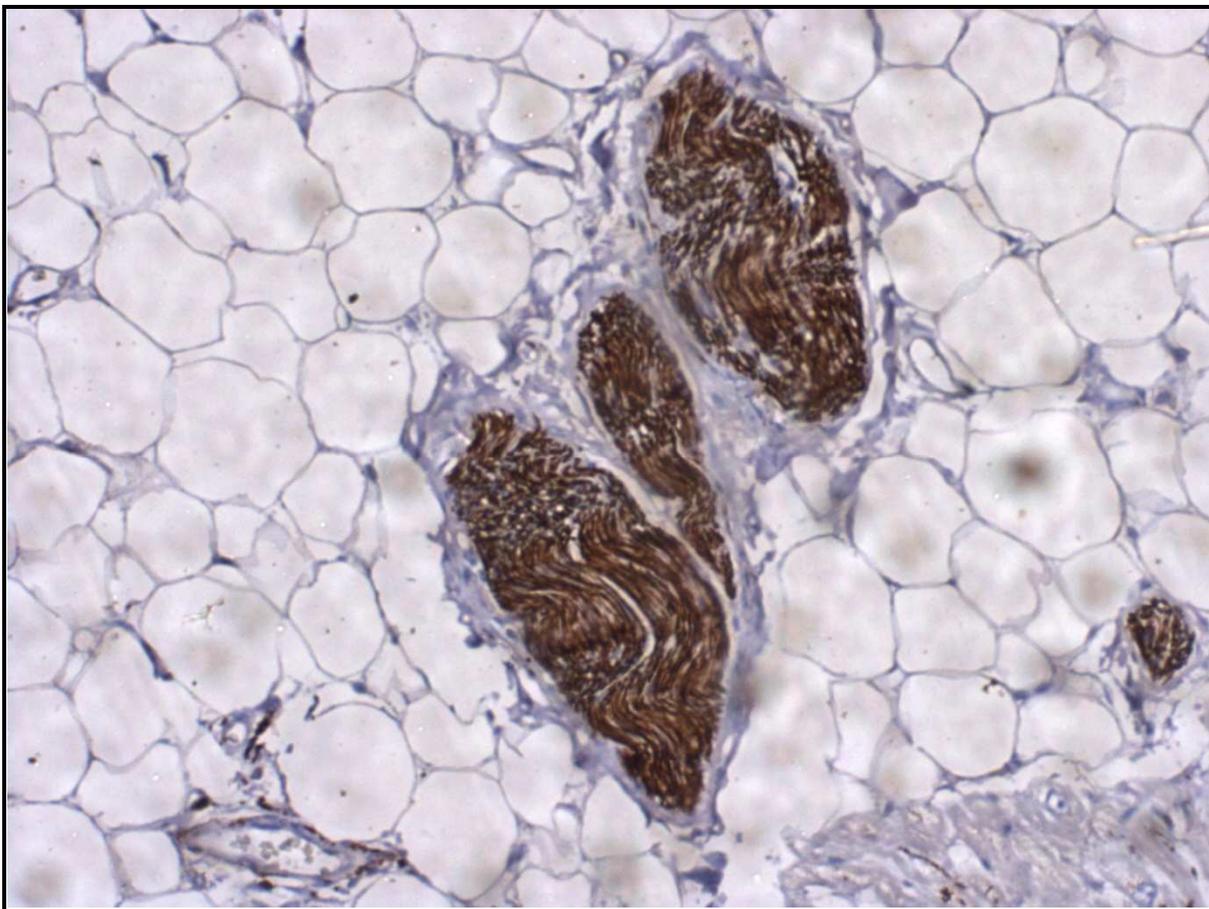


Figura 7: Foto em aumento de 400x de fibras nervosas coradas fortemente para tirosina-hidroxilase. Foto da tela do sistema de análise de imagens *Axiovision 4.6* (Carl Zeiss, Alemanha), acoplado a microscópio *Axio imager A1* da mesma marca.

As fibras pós-ganglionares adrenérgicas (simpáticas) são corados tanto pelo S-100 como pela TH e as fibras pós-ganglionares colinérgicas (parassimpáticas) são coradas apenas pelo S-100. Desta forma, foram consideradas as fibras S-100 positivas e TH positivas para determinação da inervação simpática e fibras S100 positivas e TH negativas para determinação da inervação parassimpática, avaliando as variáveis abaixo:

- Quantidade e área média de fibras nervosas S-100 positivas na sua totalidade.
- Quantidade e área média de fibras nervosas S-100 positivas e TH positivas.
- Quantidade e área média de fibras nervosas S-100 positivas e TH negativas.
- Proporção de fibras nervosas TH positivas/S-100 positivas.

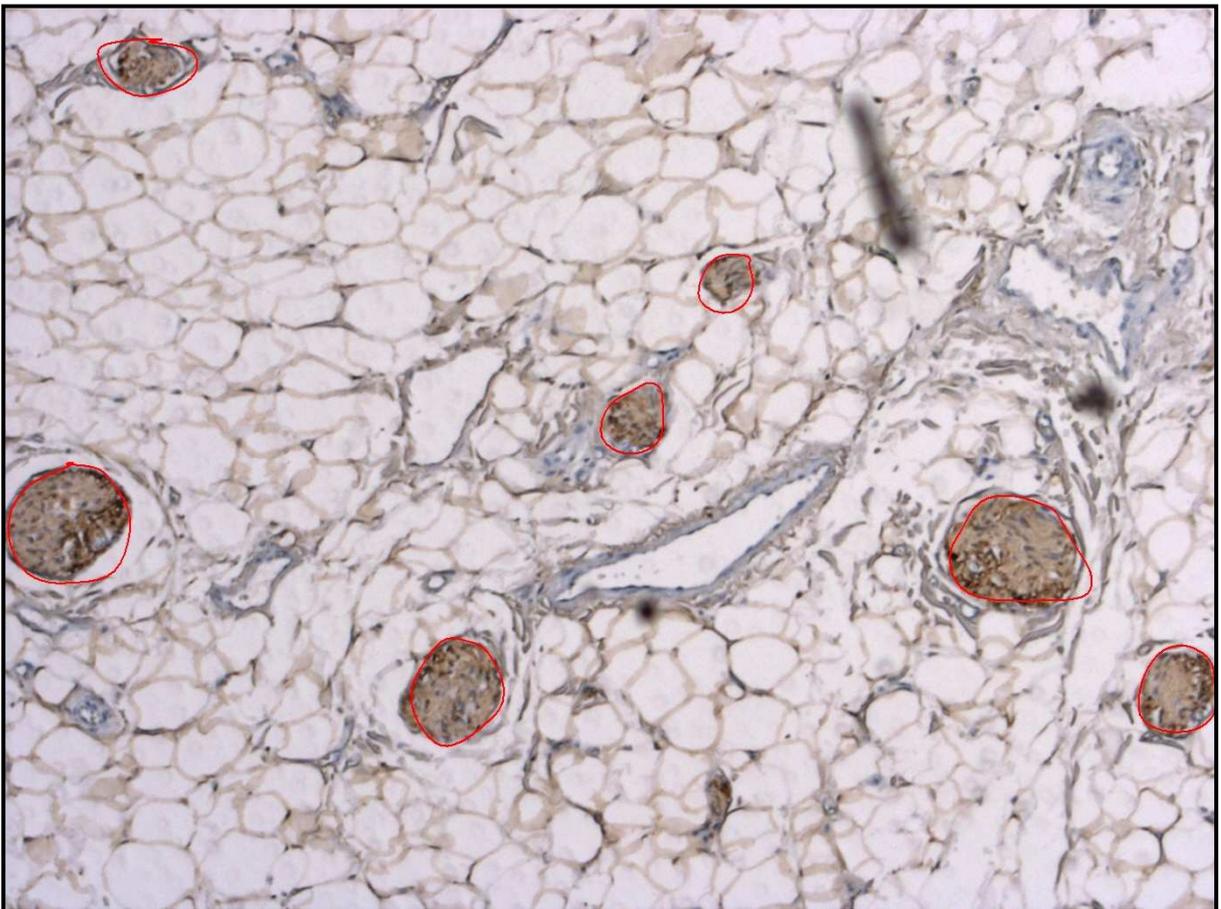


Figura 8: Foto da tela do sistema de análise de imagens *Axiovision 4.6* (Carl Zeiss, Alemanha), acoplado a microscópio *Axio imager A1* da mesma marca. Foto em aumento de 200x de fibras nervosas coradas para proteína S-100. Notar individualização em vermelho.

2.5.6 Receptores Muscarínicos

O preparo das reações para receptores muscarínicos foi idêntico ao das reações de imunoperoxidase já descritas. Foram utilizados os seguintes anticorpos com as respectivas diluições: receptor muscarínico tipo 1 1:100 (Anti-Muscarinic Acetylcholine Receptor M1 - AB5164 *Chemicon*, EUA); receptor muscarínico tipo 2 1:800 (Anti-Muscarinic Acetylcholine Receptor M2 - AB9452 *Chemicon*, EUA); receptor muscarínico tipo 3 1:200 (Anti-Muscarinic Acetylcholine Receptor M3 - AB9453 *Chemicon*, EUA); receptor muscarínico tipo 4 1:400 (Anti-Muscarinic Acetylcholine Receptor M4 - AB9219 *Chemicon*, EUA); receptor muscarínico tipo 5 1:400 (Anti-Muscarinic Acetylcholine Receptor M5 - AB9453 *Chemicon*, EUA).

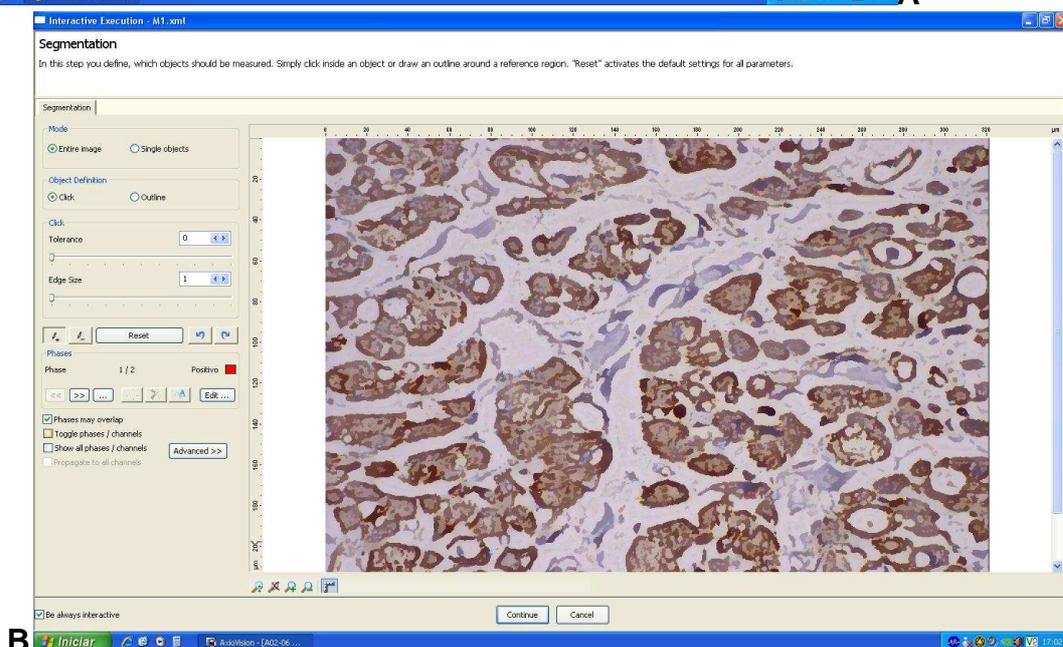
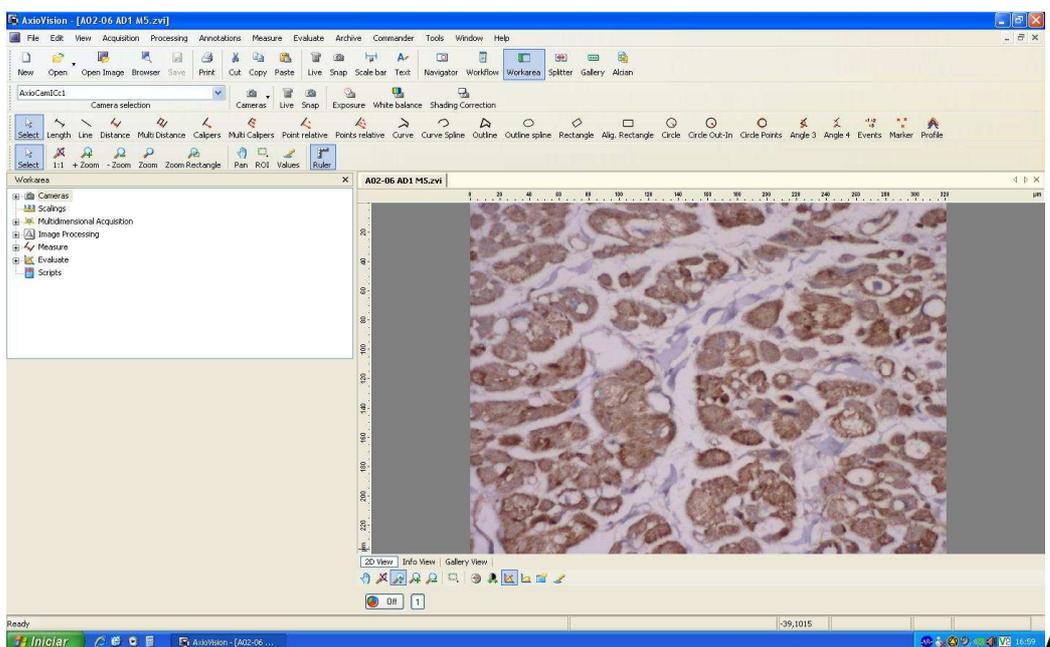
Os receptores muscarínicos (subtipos 1, 2, 3, 4 e 5) foram analisados em quatro dos nove cortes, sendo dois cortes do átrio esquerdo, (no trajeto médio da VoAe – AE1 e na junção da veia pulmonar superior esquerda – AE2), um no átrio direito (na parede posterior – AD1) e um no FP atrial esquerdo superior (FP1). A limitação de reagentes e a viabilidade financeira e logística do trabalho adotado foram os determinantes para se estudar menos cortes.

A escolha se deu pela evidência científica em regiões já apontadas como coadjuvantes na FA. Desta forma, o corte AE1 se por conter a VoAe. O corte AE2 foi estudado para os receptores muscarínicos pela presença da veia pulmonar superior esquerda. O FP1 pela presença de um plexo ganglionar anexo ao átrio esquerdo. A decisão de analisar a parede posterior do átrio direito foi de ter uma referência ao átrio esquerdo e observar se as possíveis alterações eram somente encontradas em

áreas já determinadas como foco de origem e perpetuação da FA ou se seriam alterações difusas nos átrios.

A determinação da concentração de cada um dos receptores muscarínicos foi feita através de detecção automática pelo equipamento de área positiva para o cromógeno sobre área spline miocárdica total, em micrômetros quadrados.

(Figura 9)



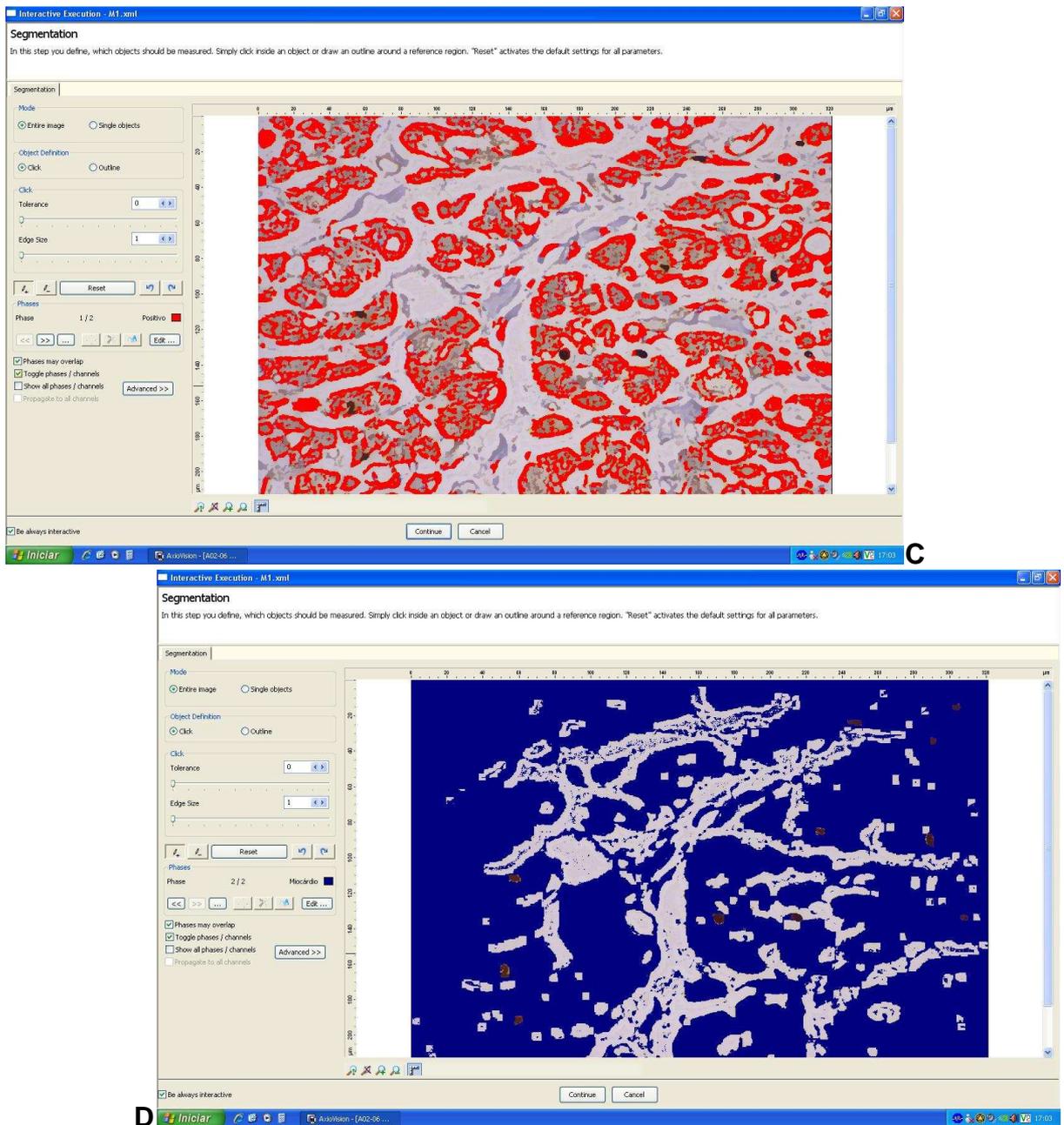


Figura 9: Foto sequencial da tela do sistema utilizado na detecção automática de cores do sistema de análise de imagens *Axiovision 4.6* (Carl Zeiss, Alemanha), acoplado a microscópio *Axio imager A1* da mesma marca. A: Foto em aumento de 200x de receptor muscarínico subtipo 3. B: Preparo da imagem para detecção automática de cores. C: Detecção de tecido miocárdico positivo para o receptor muscarínico subtipo 3. D: Detecção de todo o tecido miocárdico

Foram adquiridos três campos de cada corte, obedecendo à regra de uma foto por campo visual, partindo da parte do tecido oposta à etiqueta da lâmina. Na eventual ocorrência de artefatos, um novo campo seria analisado seguindo a mesma regra (Figura 10).

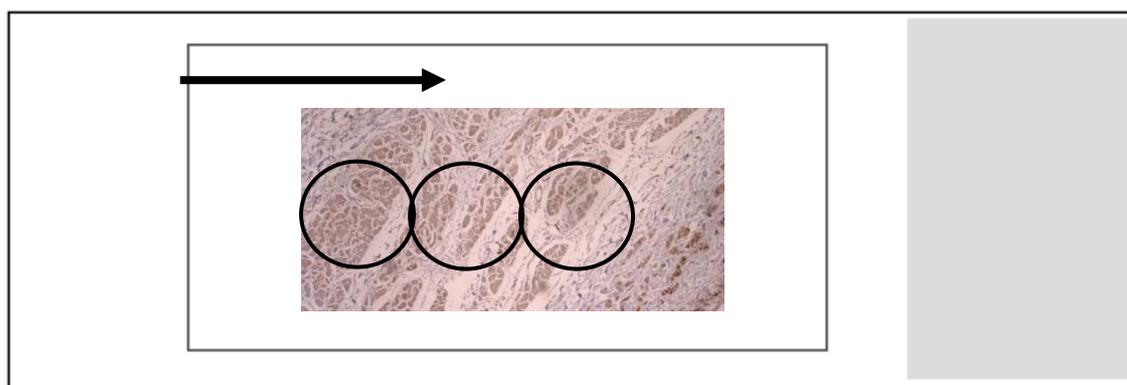


Figura 10: Desenho esquemático do método utilizado na leitura das lâminas para os receptores muscarínicos.

Os casos também foram comparados pelos dados percentuais obtidos e pela diferença entre a maior e menor proporção de área miocárdica positiva (variação), esta última visando avaliar o grau de dispersão da positividade entre os casos do grupo I e II.

2.5.7 Concentração dos Anticorpos:

Para determinação das diluições utilizadas, foram feitas reações em tecido controle (glândula salivar). Como houve intensa marcação no miocárdio, optou-se por diluições supra-ótimas (o dobro da diluição definida no controle), de modo a realçar eventuais diferenças entre os casos e aumentar a sensibilidade da reação na quantificação da área positiva para o anticorpo estudado⁴⁶.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Para as características dos pacientes e variáveis macroscópicas, os grupos foram comparados utilizando-se o teste t de Student ou Mann-Whitney no caso de variáveis quantitativas e o teste qui-quadrado ou exato de Fisher para variáveis qualitativas. Adicionalmente, nas comparações referentes a variáveis macroscópicas, foram utilizados modelos lineares generalizados (MLG) com o intuito de controlar efeitos de outras covariáveis.

Os dados microscópicos observados em diferentes campos dos cortes foram analisados por modelos de equações de estimação generalizadas (EEG), o que permitiu levar em conta as correlações entre as medidas realizadas dentro de um mesmo coração. A distribuição utilizada em cada modelo dependeu do tipo de variável dependente. Foram considerados modelos com distribuição binomial para as variáveis binárias, Poisson para dados de contagem e normal para as demais variáveis contínuas. Nas análises em que para os valores dos cortes foram considerados as médias ou medidas únicas, foi utilizado o teste t de Student não-pareado.

Como na descrição amostral a hipertensão arterial sistêmica e o volume do átrio esquerdo se revelaram diferentes entre os grupos, foram feitos testes de correlação para verificar eventual influência desses fatores nos resultados. Para as variáveis que apresentavam evidência científica de relação direta ou teste de correlação linear significativo, os resultados foram ajustados de modo a eliminar tal

influência. Foram considerados nesta situação testes de correlação linear maiores de $|0,40|$.

Os dados com distribuição normal serão apresentados em valor médio e desvio padrão (dp) e dos dados sem distribuição normal em mediana e intervalo interquartil (IIQ).

O nível de significância adotado neste estudo foi 0,05 e o programa estatístico para efetuar os cálculos foi o SPSS for Windows, versão 17.0.

2.7 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi realizado de acordo com os critérios regulamentados pelo Conselho Nacional da Saúde (CNS) Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996. Foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética do Instituto do Coração sob número 499/06/13 e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAPPesq) sob número 0890/07 (anexos).

2.8 FINANCIAMENTO

Esta pesquisa foi financiada em sua maior parte pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, sob título de projeto “Identificação e caracterização da inervação autonômica atrial e suas implicações na fibrilação atrial” sob processo nº 2007/56648-8.

Também foi recebida verba Proap, procedente do Programa de Pós-Graduação em Cardiologia do Departamento de Cardiopneumologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3. Resultados

3.1 FASE MACROANATÔMICA

Os resultados da análise da drenagem venosa da parede do átrio esquerdo, bem como das medidas do átrio esquerdo, septo ventricular e dos fat-pads se encontram na Tabela 3.1. Não houve diferença estatística entre os grupos em nenhuma das variáveis analisadas: distância entre o OSC e a VoAe, diâmetro do óstio da VoAe, diâmetro do OSC e distância entre a válvula de Vieussens e OSC. Entretanto, o diâmetro do OSC demonstra uma tendência estatística a ser maior no grupo portador de FA (grupo II).

Tabela 3.1: Comparações entre os grupos em relação a variáveis macroscópicas

	Grupo		p-valor
	I (c/ FAP) (n=13)	II (s/ FAP) (n=13)	
Peso do coração (g)	554,9 (111,8)	598,0 (158,5)	0,431
Volume do átrio esquerdo (cm ³) média (dp)	72,6 (21,6)	56,4 (15,1)	0,043**
Diâmetro do óstio do seio coronariano – média (dp)	10,9 (2,0)	9,6 (1,4)	0,066
Diâmetro do óstio da veia oblíqua do átrio esquerdo – mediana (IIQ)	1,54 (1-2)	1,25 (1-1,5)	0,406
Distância entre o óstio do seio coronariano e a veia oblíqua do átrio esquerdo – média (dp)	27,0 (6,5)	28,4 (7,0)	0,621
Espessura medida do septo ventricular – média (dp)	14,9 (4,2)	16,6 (4,1)	0,292
Diâmetro em centímetros do fat-pad atrial esquerdo superior – média (dp)	21,5 (4,3)	18,6 (5,0)	0,123
Diâmetro em centímetros do fat-pad atrial direito posterior – média (dp)	26,7 (7,0)	24,1 (7,8)	0,407
Diâmetro em centímetros do fat-pad atrial direito postero-medial – média (dp)	26,7 (4,8)	27,2 (6,7)	0,839

dp=desvio padrão, IIQ=intervalo interquartil

3.2 FASE MICROANATÔMICA

3.2.1 Análise Estrutural das Fibras Miocárdicas

O resultado da análise estrutural dos cortes é demonstrado na Tabela 3.2. Houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,023$) na presença de cruzamento de fibras entre os grupos, sendo maior nos corações sem FA (grupo II). É importante observar que as alterações microscópicas de cruzamento e interrupções de fibras miocárdicas eram presentes integralmente nos diversos cortes atriais, indicando uma possível desorganização generalizada do tecido miocárdico atrial.

Foram realizadas subanálises por corte e com análise multivariada (Tabelas 3.3 a 3.11). Por apresentarem teste de correlação linear menor que 0,15 não foram realizados ajustes para as co-variáveis hipertensão arterial e volume do átrio esquerdo.

Tabela 3.2 – Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas

Variável	Grupo		Odds Ratio (IC95%)	p-valor
	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)		
Mudança na orientação das fibras acima de 90°	43,6 (6,3)	45,3 (5,7)	0,933 (0,473; 1,839)	0,841
Deflexões pericárdicas	9,4 (2,1)	14,5 (2,5)	0,610 (0,329; 1,134)	0,118
Cruzamento de fibras	79,5 (4,1)	91,5 (2,9)	0,362 (0,151; 0,868)	0,023*
Interrupções de fibras miocárdicas	70,1 (3,5)	61,5 (3,7)	1,464 (0,940; 2,280)	0,092

Dados em estimativas de porcentagens com erros padrão entre parênteses; IC=intervalo de confiança. *diferença significativa.

Tabela 3.3 – Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas, por corte – AD1

Variável	Grupo		Odds Ratio	p-valor
	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)	(IC 95%)	
Mudança na orientação das fibras acima de 90°	1 (7,7%)	2 (15,4%)	0,458 (0,036; 5,789)	0,547
Deflexões pericárdicas	-	-	-	-
Cruzamento de fibras	10 (76,9%)	13 (100%)	nc	0,220 ^F
Interrupções de fibras miocárdicas	10 (76,9%)	9 (69,2%)	1,481 (0,258; 8,499)	0,659

Dados em frequências simples e porcentagens; F= teste exato de Fisher; IC=intervalo de confiança; nc= modelo não convergiu.

Tabela 3.4 – Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas, por corte – AD2

Variável	Grupo		Odds Ratio	p-valor
	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)	(IC 95%)	
Mudança na orientação das fibras acima de 90°	6 (46,2%)	3 (23,1%)	2,857 (0,528; 15,473)	0,223
Deflexões pericárdicas	-	3 (23,1%)	-	0,220 ^F
Cruzamento de fibras	12 (92,3%)	13 (100%)	nc	> 0,999 ^F
Interrupções de fibras miocárdicas	12 (92,3%)	8 (61,5%)	7,540 (0,733; 76,773)	0,090

Dados em frequências simples e porcentagens; F= teste exato de Fisher; IC=intervalo de confiança; nc= modelo não convergiu.

Tabela 3.5 – Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas, por corte – AE1

Variável	Grupo		Odds Ratio (IC 95%)	p-valor
	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)		
Mudança na orientação das fibras acima de 90°	7 (53,8%)	8 (61,5%)	0,729 (0,153; 3,474)	0,692
Deflexões pericárdicas	-	1(7,7%)	-	> 0,999 ^F
Cruzamento de fibras	12 (92,3%)	13 (100%)	nc	> 0,999 ^F
Interrupções de fibras miocárdicas	8 (61,5%)	9 (69,2%)	0,711 (0,140; 3,606)	0,681

Dados em frequências simples e porcentagens; F= teste exato de Fisher; IC=intervalo de confiança; nc= modelo não convergiu.

Tabela 3.6 – Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas, por corte – AE2

Variável	Grupo		Odds Ratio (IC 95%)	p-valor
	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)		
Mudança na orientação das fibras acima de 90°	8 (61,5%)	5 (38,5%)	2,560 (0,527; 12,431)	0,244
Deflexões pericárdicas	-	1 (7,7%)	-	>0,999 ^F
Cruzamento de fibras	8 (61,5%)	9 (69,2%)	0,711 (0,140; 3,606)	0,681
Interrupções de fibras miocárdicas	10 (76,9%)	8 (61,5%)	2,083 (0,378; 11,482)	0,399

Dados em frequências simples e porcentagens; F= teste exato de Fisher; IC=intervalo de confiança; nc= modelo não convergiu.

Tabela 3.7 – Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas, por corte – AE3

Variável	Grupo		Odds Ratio	p-valor
	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)	(IC 95%)	
Mudança na orientação das fibras acima de 90°	4 (30,8%)	6 (46,2%)	0,519 (0,104; 2,581)	0,423
Deflexões pericárdicas	-	-	-	-
Cruzamento de fibras	11 (84,6%)	13 (100%)	nc	0,480 ^F
Interrupções de fibras miocárdicas	12 (92,3%)	9 (69,2%)	5,333 (0,546; 56,236)	0,164

Dados em frequências simples e porcentagens; F= teste exato de Fisher; IC=intervalo de confiança; nc= modelo não convergiu.

Tabela 3.8 – Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas, por corte – FP1

Variável	Grupo		Odds Ratio	p-valor
	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)	(IC 95%)	
Mudança na orientação das fibras acima de 90°	7 (53,8%)	10 (76,9%)	0,354 (0,065; 1,895)	0,223
Deflexões pericárdicas	1 (7,7%)	2 (15,4%)	0,458 (0,036; 5,789)	0,547
Cruzamento de fibras	11 (84,6%)	12 (92,3%)	nc	0,547
Interrupções de fibras miocárdicas	9 (69,2%)	6 (46,2%)	2,625 (0,527; 13,068)	0,239

Dados em frequências simples e porcentagens; F= teste exato de Fisher; IC=intervalo de confiança; nc= modelo não convergiu.

Tabela 3.9 – Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas, por corte – FP2

Variável	Grupo		Odds Ratio	p-valor
	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)	(IC 95%)	
Mudança na orientação das fibras acima de 90°	8 (61,5%)	9 (69,2%)	0,711 (0,140; 3,606)	0,711
Deflexões pericárdicas	6 (46,2%)	5 (38,5%)	1,371 (0,288; 6,535)	0,692
Cruzamento de fibras	10 (76,9%)	12 (92,3%)	0,278 (0,025; 3,104)	0,298
Interrupções de fibras miocárdicas	10 (76,9%)	11 (84,6%)	0,606 (0,083; 4,405)	0,621

Dados em frequências simples e porcentagens; F= teste exato de Fisher; IC=intervalo de confiança; nc= modelo não convergiu.

Tabela 3.10 – Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas, por corte – FP3

Variável	Grupo		Odds Ratio	p-valor
	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)	(IC 95%)	
Mudança na orientação das fibras acima de 90°	8 (61,5%)	10 (76,9%)	0,480 (0,087; 2,645)	0,399
Deflexões pericárdicas	4 (30,8%)	5 (38,5%)	0,711 (0,140; 3,606)	0,681
Cruzamento de fibras	13 (100%)	12 (92,3%)	nc	>0,999 ^f
Interrupções de fibras miocárdicas	11 (84,6%)	12 (92,3%)	0,458 (0,036; 5,789)	0,547

Dados em frequências simples e porcentagens; F= teste exato de Fisher; IC=intervalo de confiança; nc= modelo não convergiu.

Tabela 3.11 – Comparações entre os grupos em relação à análise estrutural das fibras miocárdicas, por corte – SIV

Variável	Grupo		Odds Ratio (IC 95%)	p-valor
	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)		
Mudança na orientação das fibras acima de 90°	2 (15,4%)	-	-	0,480 ^F
Deflexões pericárdicas	-	-	-	-
Cruzamento de fibras	6 (46,2%)	10 (76,9%)	0,257 (0,047; 1,393)	0,115
Interrupções de fibras miocárdicas	-	-	-	-

Dados em frequências simples e porcentagens; F= teste exato de Fisher; IC=intervalo de confiança; nc= modelo não convergiu.

Os dados resultantes da análise das espessuras médias do endocárdio, miocárdio e pericárdio encontram-se na Tabela 3.12. A espessura média do endocárdio foi maior no Grupo II (sem FAP) e as demais medidas foram iguais para os dois grupos estudados.

Tabela 3.12 – Comparações entre os grupos em relação à espessura média do endocárdio, miocárdio e epicárdio.

Variável	Grupo		Diferença média (IC95%)	p-valor
	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)		
Espessura média do endocárdio	399,9 (27,2)	530,6 (59,8)	-130,6 (-259,9; -1,4)	0,048*
Espessura média do miocárdio	3410,4 (208,5)	3698,7 (159,9)	-288,3 (-803,5; 226,8)	0,273
Espessura média do epicárdio	1626,0 (198,5)	1630,6 (227,7)	-4,5 (-596,5; 587,5)	0,988

Dados em médias e erros padrão entre parênteses; IC=intervalo de confiança. *teste significativo.

Ao analisarmos todos os cortes separadamente, foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa apenas quanto à espessura do endocárdio na região FP1 (menor média no grupo I, $p=0,035$). No entanto, após ajuste para as covariáveis determinadas em todos os cortes (hipertensão arterial e volume do átrio esquerdo), o efeito deixou de ser significativo especificamente no FP1 ($p=0,189$). O coeficiente de correlação linear neste caso foi de $r = - 0,47$.

3.2.2 Fibrose Miocárdica

Os dados da análise do percentual médio de fibrose (colágeno) no miocárdio entre os dois grupos são demonstrados na Tabela 3.13. Não houve diferença estatística entre os grupos analisados.

Adicionalmente, também foram realizados testes utilizando o percentual médio por coração e por corte como subanálise, resultando na mesma ausência de diferença estatística entre os grupos estudados (Tabela 3.14). Também foram realizados cálculos com ajustes para hipertensão arterial e volume do átrio esquerdo conforme evidência científica como fatores de risco^{27,28}.

Tabela 3.13 - Comparações entre os grupos em relação à percentagem de fibrose no miocárdio

Percentual da área de colágeno	% Colágeno		p-valor
	Grupo I (c/ FAP)	Grupo II (s/ FAP)	
Todos os cortes*	25,99 (8,68)	23,16 (6,08)	0,345
Cortes supraventriculares - AD1, AD2, AE1, AE2, AE3, FP1, FP2 e FP3**	26,75 (9,38)	23,47 (6,76)	0,317
Cortes atriais - AD1, AD2, AE1, AE2 e AE3***	26,13 (10,23)	22,51 (6,29)	0,290

* em todos os cortes analisados; ** em todos os cortes, exceto o septo ventricular, *** em todos os cortes atriais. Valores expressos em média (desvio padrão).

Tabela 3.14 - Comparações entre os grupos em relação à percentagem de fibrose no miocárdio – por corte

Corte	% Colágeno		p-valor
	Grupo I (c/ FAP)	Grupo II (s/ FAP)	
AD1	26,86 (2,64)	22,52 (1,96)	0,200 0,101*
AD2	28,93 (3,46)	21,85 (1,94)	0,087 0,257*
AE1	21,94 (4,74)	20,01 (2,36)	0,718 0,760*
AE2	27,84 (4,84)	28,69 (3,96)	0,893 0,592*
AE3	21,11 (2,93)	20,37 (2,20)	0,842 0,868*
FP1	28,98 (3,38)	22,79 (3,10)	0,190 0,583*
FP2	29,99 (4,22)	27,23 (3,58)	0,623 0,921*
FP3	25,35 (3,69)	24,89 (2,27)	0,916 0,694*
SIV	21,84 (3,07)	20,61 (1,43)	0,719 0,981*

Valores expressos em média (desvio padrão) ; * incluindo as covariáveis volume de átrio esquerdo e HAS

3.2.3 Sistema Nervoso Autônomo Cardíaco Intrínseco:

O SNA cardíaco intrínseco, analisado através da tirosina-hidroxilase e S-100 em observações por coração, apresentou diferença significativa na área por fibra nervosa S-100 positivo, o que sugere fibras nervosas com menor relação área/nervo nos corações do grupo portador de FAP, conforme a Tabela 3.15. Também foram realizadas subanálises por cada corte, conforme demonstradas na Tabelas 3.16.

Por não haver na literatura trabalhos que analisassem possíveis interações entre volume do átrio esquerdo e hipertensão arterial com inervação do SNA cardíaco intrínseco, optamos por realizar testes de correlação linear entre as variáveis volume do átrio esquerdo e hipertensão arterial com inervação do SNA cardíaco intrínseco, resultando o coeficiente r com valores entre -0,10 e 0,14. Desta forma, estes resultados não foram ajustados para estas co-variáveis.

Algumas amostras tiveram mais fibras positivas para TH que para S-100. Isso decorreu de diferenças entre os cortes, ainda que estes fossem adjacentes. Nesses casos, considerou-se todos as fibras como adrenérgicas, em proporção de 100%.

Tabela 3.15 - Comparações entre os grupos em relação ao sistema nervoso cardíaco intrínseco

Variável	Grupo		Diferença média (IC95%)	p-valor
	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)		
Número de fibras nervosas S-100 positivas (unidades)	22,9 (2,4)	21,3 (2,3)	1,6 (-5,0; 8,1)	0,639
Área total de fibras nervosas S-100 positivas (μm^2)	157.248,3 (18.969,8)	184.720,5 (24.651,9)	-27.472,1 (-88.438,5; 33.494,2)	0,377
Média da área por fibras S-100 positivas (μm^2)	5.791,5 (421,3)	7.719,7 (779,2)	-1.928,2 (-3664,4; -192,1)	0,029*
Número de fibras nervosas TH positivas (simpáticas)	4,8 (1,3)	3,2 (0,6)	1,5 (-1,3; 4,4)	0,246
Área total de fibras nervosas TH positivas (μm^2)	43.523,8 (11.160,2)	52.093,8 (15.124,8)	-8.570,0 (-45.410,5; 28.270,5)	0,648
Média da área por fibras nervosas TH positiva (μm^2)	5.213,9 (633,0)	6986,5 (1.360,2)	-1.772,6 (-4.713,2; 1.167,9)	0,237
Diferença entre o número de fibras nervosas S-100+ e TH+ (parassimpáticas)	18,2 (2,1)	18,1 (2,2)	0,1 (-5,9; 6,1)	0,973
Diferença entre a área de fibras nervosas S-100+ e TH+ (μm^2)	115.824,5 (16.064,8)	133.656,1 (14.933,8)	-17.831,6 (-60.821,3; 25.158,1)	0,416
Média da área por fibras nervosas TH negativa (μm^2)	6,104,7 (845,0)	7.416,6 (654,4)	-1.311,9 (-3406,6; 782,8)	0,220
Percentual de fibras nervosas simpáticas (TH+)	19,8 (5,1)	13,9 (3,0)	5,9 (-5,7; 17,5)	0,321
Percentual da área de fibras nervosas simpáticas (TH+)	22,9 (4,8)	15,8 (3,0)	7,1 (-4,1; 18,3)	0,214

TH: tirosina-hidroxilase. Dados em estimativas de médias e erros padrão entre parênteses; IC=intervalo de confiança. Métodos estatísticos utilizados: EEG com distribuição de Poisson para o número de fibras nervosas (TH, S-100 e diferença) e modelo misto com distribuição Normal para as demais variáveis.

Tabela 3.16 - Comparações entre os grupos em relação ao sistema nervoso cardíaco intrínseco – por corte

Variável	Grupo		p-valor
	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)	
AD1			
Número de fibras nervosas S-100 positivas (unidades)	4,77 (1,29)	6,69 (1,24)	0,042
Número de fibras nervosas TH positivas (simpáticas)	0,23 (0,17)	0,31 (0,17)	0,706
Diferença entre o número de fibras nervosas S-100+ e TH+ (parassimpáticas)	4,54 (1,32)	6,38 (1,24)	0,045
AD2			
Número de fibras nervosas S-100 positivas (unidades)	20,31 (4,01)	19,46 (3,05)	0,629
Número de fibras nervosas TH positivas (simpáticas)	4,54 (1,41)	2,77 (0,91)	0,019
Diferença entre o número de fibras nervosas S-100+ e TH+ (parassimpáticas)	15,77 (3,63)	16,69 (2,94)	0,559
AE1			
Número de fibras nervosas S-100 positivas (unidades)	36,62 (5,30)	37,38 (7,19)	0,747
Número de fibras nervosas TH positivas (simpáticas)	12,85 (4,66)	9,92 (3,55)	0,028
Diferença entre o número de fibras nervosas S-100+ e TH+ (parassimpáticas)	23,77 (3,63)	27,46 (6,88)	0,063
AE2			
Número de fibras nervosas S-100 positivas (unidades)	20,85 (3,84)	10,23 (1,42)	<0,001
Número de fibras nervosas TH positivas (simpáticas)	4,54 (2,05)	1,46 (0,82)	<0,001
Diferença entre o número de fibras nervosas S-100+ e TH+ (parassimpáticas)	16,31 (2,73)	8,77 (1,5)	< 0,001
AE3			
Número de fibras nervosas S-100 positivas (unidades)	8,54 (1,96)	6,77 (1,22)	0,104
Número de fibras nervosas TH positivas (simpáticas)	1,46 (0,69)	0,54 (0,18)	0,024
Diferença entre o número de fibras nervosas S-100+ e TH+ (parassimpáticas)	7,08 (1,81)	6,63 (1,23)	0,403
FP1			
Número de fibras nervosas S-100 positivas (unidades)	38,92 (5,81)	38,00 (5,46)	0,704
Número de fibras nervosas TH positivas (simpáticas)	8,23 (2,36)	6,42 (1,73)	0,096
Diferença entre o número de fibras nervosas S-100+ e TH+ (parassimpáticas)	30,69 (5,17)	33,54 (4,56)	0,215
FP2			
Número de fibras nervosas S-100 positivas (unidades)	40,54 (6,34)	34,62 (5,92)	0,014
Número de fibras nervosas TH positivas (simpáticas)	5,33 (1,80)	4,54 (1,10)	0,371

Tabela 3.16 - Comparações entre os grupos em relação ao sistema nervoso cardíaco intrínseco – por corte (continuação)

Diferença entre o número de fibras nervosas S100+ e TH+ (parassimpáticas)	37,42 (5,78)	30,08 (5,68)	0,002
FP3			
Número de fibras nervosas S-100 positivas (unidades)	32,54 (3,14)	33,23 (6,19)	0,758
Número de fibras nervosas TH positivas (simpáticas)	4,92 (1,31)	3,54 (0,71)	0,088
Diferença entre o número de fibras nervosas S-100+ e TH+ (parassimpáticas)	27,62 (3,54)	29,69 (5,98)	0,323
SIV			
Número de fibras nervosas S-100 positivas (unidades)	2,92 (0,51)	4,54 (1,30)	0,034
Número de fibras nervosas TH positivas (simpáticas)	0,92 (0,42)	0,31 (0,17)	0,057
Diferença entre o número de fibras nervosas S-100+ e TH+ (parassimpáticas)	2,00 (0,47)	4,23 (1,29)	0,002

TH: tirosina-hidroxilase. Dados em estimativas de médias e erros padrão entre parênteses. Métodos estatísticos utilizados: EEG com distribuição de Poisson para o número de fibras nervosas (TH, S-100 e diferença) e modelo misto com distribuição Normal para as demais variáveis.

3.2.4 Receptores Muscarínicos:

As amostras de todos os corações tiveram todos os receptores muscarínicos analisados. Entretanto, um corte do átrio esquerdo (AE1) do coração número 13 do grupo I, não pôde ser analisado. Seguem abaixo as tabelas com os resultados da porcentagem de miocárdio positivo para cada subtipo de receptor, bem como da variação de miocárdio positivo no mesmo corte.

Por não haver trabalhos que analisassem possíveis interações entre volume do átrio esquerdo com a expressão dos receptores muscarínicos, foram realizados testes de correlação linear entre as variáveis volume do átrio esquerdo e

hipertensão arterial com a percentagem de miocárdio positivo para os receptores muscarínicos, com resultados do coeficiente entre 0,01 e 0,27. Desta forma, estes resultados não foram ajustados para estas co-variáveis.

Os receptores muscarínicos subtipo 1 demonstram um aumento quase difuso, exceto pelo corte AE2. Entretanto ao analisarmos o átrio esquerdo em conjunto (AE1 + AE2), bem como o total dos cortes, há aumento significativo da expressão dos receptores muscarínicos subtipo 1. Não houve alterações significativas na variação da percentagem de miocárdica positiva para receptor M1, exceto no corte FP1. Tais resultados são apresentados na Tabela 3.17 e na Figura 11; exemplo de reação de imuno-histoquímica aparece na Figura 12.

Tabela 3.17 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores muscarínicos subtipo 1 (M1).

Corte	% de miocárdio positivo			Variação de % de miocárdio positivo		
	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)	p-valor	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)	p-valor
Átrio direito – parede posterior – AD1	6,47 (3,39)	2,77 (1,38)	0,001*	4,55 (4,96)	2,52 (2,20)	0,110
Átrio esquerdo – trajeto médio da VoAe – AE1	5,56 (4,64)	2,22 (1,48)	0,021*	2,98 (3,06)	1,72 (1,29)	0,189
Átrio esquerdo - na junção da veia pulmonar superior esquerda – AE2	6,39 (5,30)	4,30 (4,03)	0,286	5,00 (7,45)	3,14 (3,33)	0,424
Átrio esquerdo – cortes AE1 e AE2	6,09 (3,61)	3,33 (2,15)	0,028*	8,57 (7,88)	5,24 (5,04)	0,213
FP atrial esquerdo superior – FP1	5,15 (4,89)	2,12 (0,93)	0,038*	5,00 (5,99)	1,20 (0,72)	0,041*
Todos os cortes (4)	5,84 (2,60)	2,92 (1,31)	0,002*	6,66 (5,59)	3,63 (3,53)	0,113

Dados em estimativas de porcentagens e desvio-padrão entre parênteses. FP – “fat-pad”. I – Grupo I com FAP e II – Grupo II sem FAP. * - Teste estatisticamente significativo.

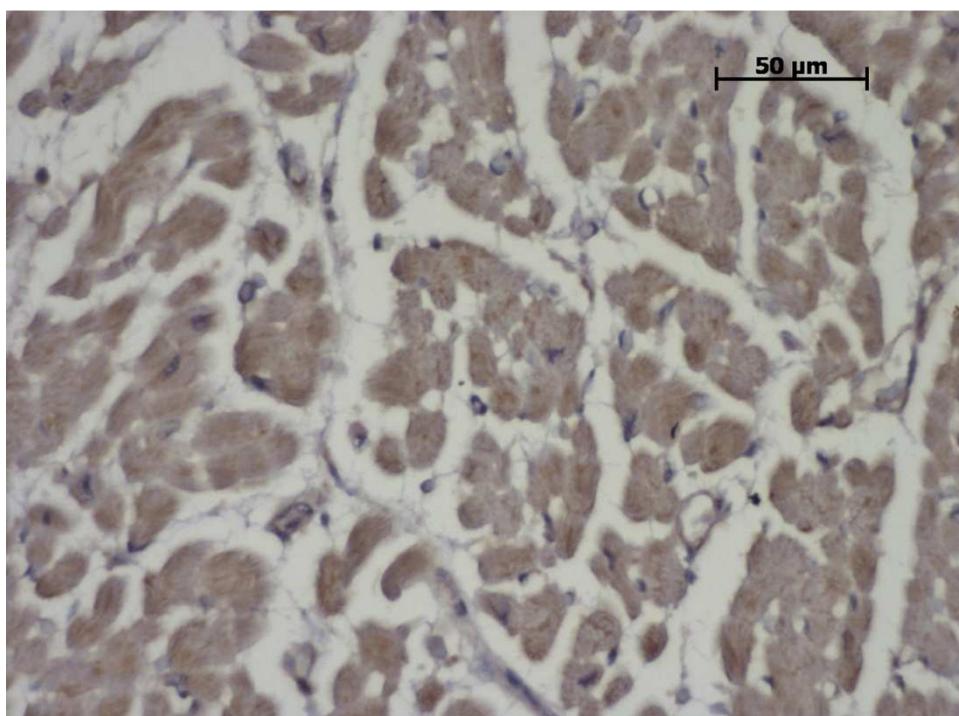
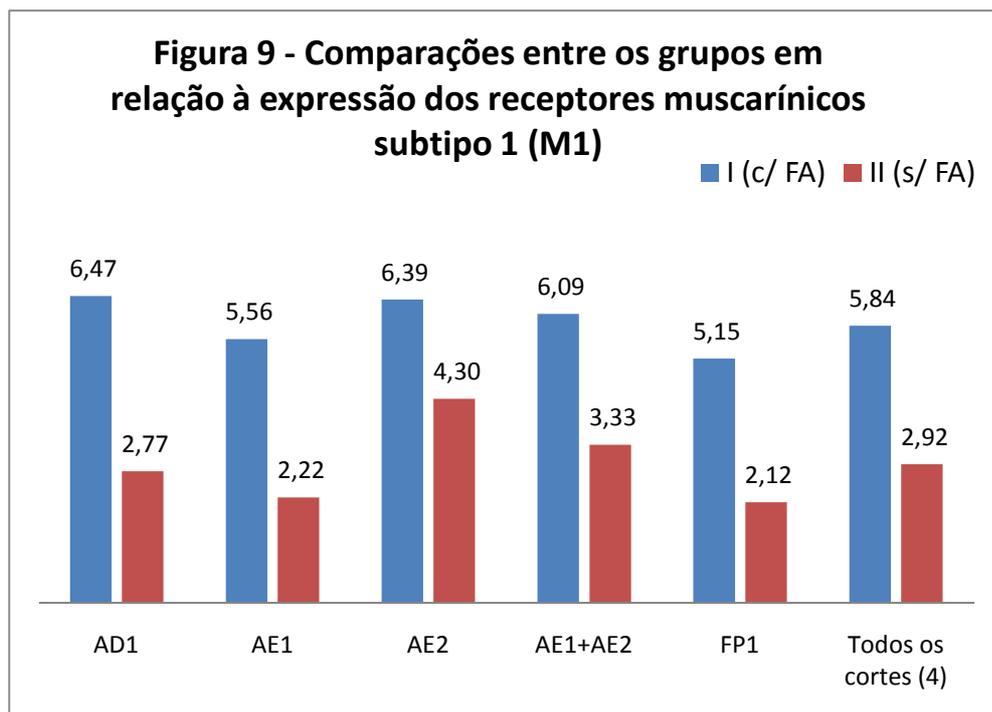


Figura 12 – Exemplo de fotomicroscopia com coloração para receptor muscarínico subtipo 1. Aumento da objetiva 20x.

Os resultados referentes aos receptores muscarínicos subtipo 2 são apresentados na Tabela 3.18. Houve diferença estatística em suas expressões entre os dois grupos estudados nos cortes do FP1 com aumento no grupo I (com FAP). Os demais cortes não apresentaram diferenças significantes.

Tabela 3.18 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores muscarínicos subtipo 2 (M2).

Corte	% de miocárdio positivo			Variação de % de miocárdio positivo		
	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)	p-valor	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)	p-valor
Átrio direito – parede posterior – AD1	7,38 (6,61)	6,69 (6,01)	0,631	5,44 (6,16)	6,13 (5,53)	0,765
Átrio esquerdo – trajeto médio da VoAe – AE1	5,66 (3,55)	3,74 (2,13)	0,109	4,61 (6,33)	2,75 (2,41)	0,338
Átrio esquerdo - na junção da veia pulmonar superior esquerda – AE2	7,85 (4,31)	14,25 (16,88)	0,207	4,84 (2,73)	11,31 (10,76)	0,055
Átrio esquerdo – cortes AE1 e AE2	7,11 (3,58)	10,11 (10,23)	0,333	9,52 (6,22)	19,00 (18,77)	0,105
FP atrial esquerdo superior – FP1	5,67 (2,39)	3,63 (2,32)	0,037*	4,52 (2,77)	3,84 (3,90)	0,611
Todos os cortes (4)	6,77 (2,94)	7,75 (5,96)	0,598	10,88 (5,06)	13,68 (15,59)	0,172

Dados em estimativas de porcentagens e desvio-padrão entre parênteses. FP – “fat-pad”. I – Grupo I com FAP e II – Grupo II sem FAP. * - Teste estatisticamente significativo.

Os receptores muscarínicos subtipo 3 apresentaram seus resultados conforme a Tabela 3.19. Assim como os receptores M2, os casos do grupo I apresentaram aumento significativo de sua expressão no miocárdio subjacente ao FP1. Os demais cortes não apresentam diferença.

Tabela 3.19 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores muscarínicos subtipo 3 (M3).

Corte	% de miocárdio positivo			Variação de % de miocárdio positivo		
	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)	p-valor	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)	p-valor
Átrio direito – parede posterior – AD1	43,54 (19,08)	31,05 (18,61)	0,105	16,68 (11,38)	22,96 (16,15)	0,272
Átrio esquerdo – trajeto médio da VoAe – AE1	37,61 (20,97)	29,10 (18,38)	0,298	18,55 (13,64)	20,82 (14,39)	0,690
Átrio esquerdo - na junção da veia pulmonar superior esquerda – AE2	42,38 (18,45)	46,55 (19,61)	0,582	25,53 (14,55)	17,64 (10,73)	0,130
Átrio esquerdo – cortes AE1 e AE2	40,29 (18,38)	38,66 (15,52)	0,802	35,23 (14,82)	43,02 (17,03)	0,226
FP atrial esquerdo superior – FP1	30,95 (13,27)	20,13 (9,58)	0,026*	28,06 (16,95)	17,97 (7,82)	0,068
Todos os cortes (4)	34,29 (10,47)	30,16 (9,44)	0,302	31,26 (12,94)	38,22 (13,21)	0,187

Dados em estimativas de porcentagens e desvio-padrão entre parênteses. FP – “fat-pad”. I – Grupo I com FAP e II – Grupo II sem FAP. * - Teste estatisticamente significativo.

Os receptores muscarínicos subtipo 4 apresentaram somente diferença estatística com aumento em suas expressões miocárdicas e na variação do percentual do miocárdio positivo no grupo I nos cortes do AE1, com aumento no grupo 1. Os demais cortes não apresentaram diferenças significantes, embora houvesse tendência estatística na avaliação total dos cortes (dados presentes na Tabela 3.20).

Tabela 3.20 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores muscarínicos subtipo 4 (M4).

Corte	% de miocárdio positivo			Variação de % de miocárdio positivo		
	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)	p-valor	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)	p-valor
Átrio direito – parede posterior – AD1	9,14 (5,48)	5,76 (7,48)	0,202	8,10 (4,94)	5,61 (6,99)	0,307
Átrio esquerdo – trajeto médio da VoAe – AE1	9,90 (6,68)	4,45 (4,57)	0,023*	8,26 (8,06)	3,09 (2,22)	0,042*
Átrio esquerdo - na junção da veia pulmonar superior esquerda – AE2	7,64 (4,00)	8,42 (5,66)	0,689	6,03 (4,65)	10,92 (9,89)	0,125
Átrio esquerdo – cortes AE1 e AE2	8,79 (4,32)	6,77 (3,66)	0,212	13,53 (8,03)	14,09 (10,32)	0,879
FP atrial esquerdo superior – FP1	8,18 (11,73)	3,76 (1,96)	0,203	4,07 (3,67)	2,86 (1,82)	0,301
Todos os cortes (4)	8,70 (4,91)	5,72 (3,08)	0,0783	11,42 (9,82)	8,70 (6,88)	0,422

Dados em estimativas de porcentagens e desvio-padrão entre parênteses. FP – “fat-pad”. I – Grupo I com FAP e II – Grupo II sem FAP. * - Teste estatisticamente significativo.

Não houve alteração estatisticamente significativa na expressão miocárdica dos receptores muscarínicos subtipo 5 entre os grupos analisados, conforme demonstrado na Tabela 3.21. Este resultado se deve a um grande desvio padrão nas observações em cada corte.

Exemplo da reação por imuno-histoquímica para o subtipo 5 dos receptores muscarínicos é apresentado na Figura 13. Também foi observado um padrão diferente de marcação para o receptor M5, aparentemente delineando os discos intercalares. Esta alteração é mais evidente em cortes longitudinais à fibra miocárdica (Figura 14).

Tabela 3.21 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores muscarínicos subtipo 5 (M5).

Corte	% de miocárdio positivo			Variação de % de miocárdio positivo		
	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)	p-valor	I (c/ FAP)	II (s/ FAP)	p-valor
Átrio direito – parede posterior – AD1	18,94 (11,94)	14,51 (9,37)	0,303	16,12 (13,54)	18,67 (15,74)	0,662
Átrio esquerdo – trajeto médio da VoAe – AE1	12,92 (11,34)	8,68 (12,15)	0,369	8,40 (7,19)	9,16 (13,76)	0,863
Átrio esquerdo - na junção da veia pulmonar superior esquerda – AE2	20,93 (22,81)	18,31 (15,92)	0,738	9,69 (10,02)	17,18 (15,47)	0,158
Átrio esquerdo – cortes AE1 e AE2	18,08 (16,67)	14,58 (13,18)	0,559	20,82 (17,54)	24,32 (18,65)	0,627
FP atrial esquerdo superior – FP1	12,06 (9,32)	9,83 (10,40)	0,570	10,65 (10,41)	9,96 (10,98)	0,871
Todos os cortes (4)	16,10 (11,08)	13,35 (9,69)	0,546	19,53 (18,81)	15,83 (10,65)	0,544

Dados em estimativas de porcentagens e desvio-padrão entre parênteses. FP – “fat-pad”. I – Grupo I com FAP e II – Grupo II sem FAP. * - Teste estatisticamente significativo.

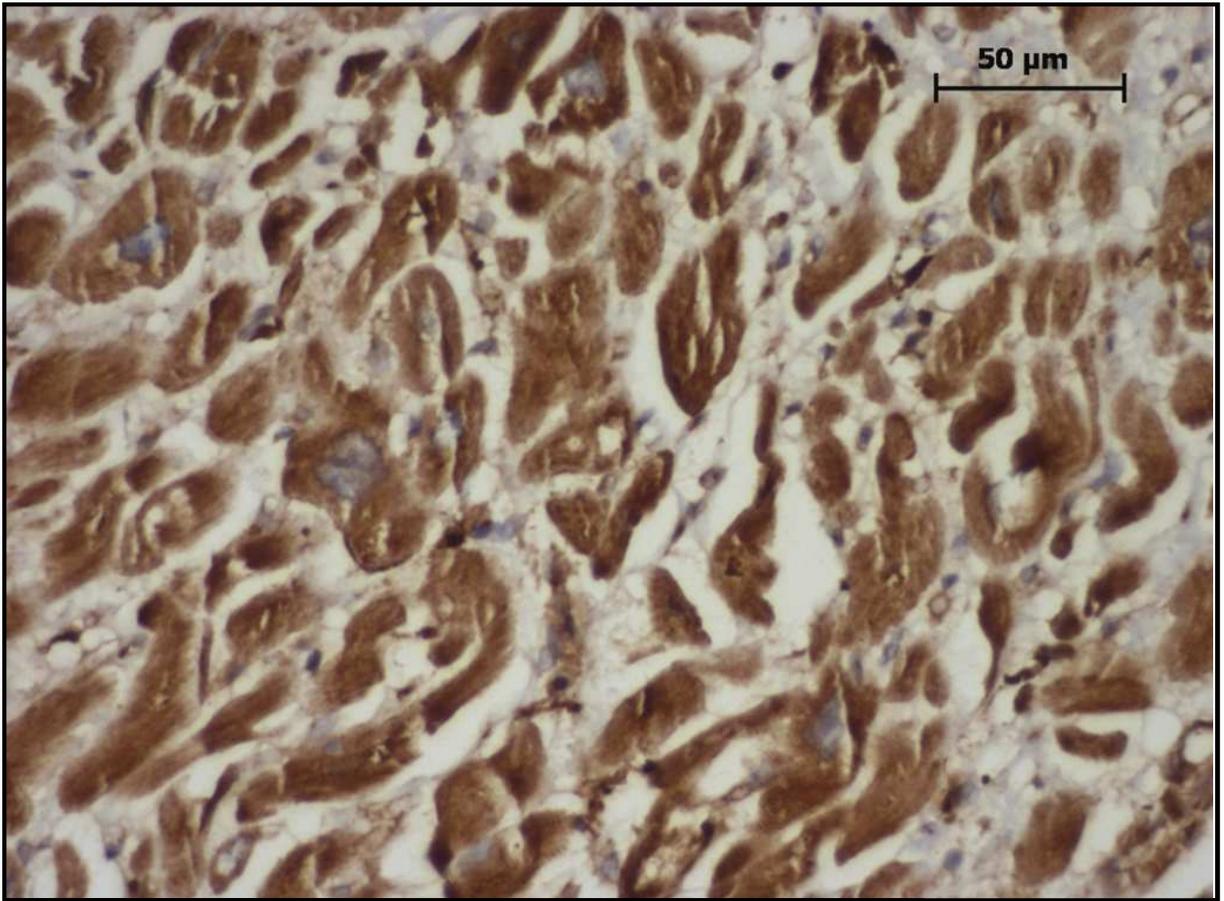


Figura 13 – Exemplo de fotomicroscopia com coloração para receptor muscarínico subtipo 5. Aumento da objetiva 20x. Notar intensa marcação.



Figura 14 – Exemplo de fotomicroscopia com coloração para receptor muscarínico subtipo 5. Aumento da objetiva 40x. Notar padrão de disco intercalado (setas).

3.2.5 Sumário dos Resultados referentes ao Sistema Nervoso Autônomo e Receptores Muscarínicos:

A figura 15 demonstra sumariamente os resultados das alterações encontradas na inervação total, simpática e parassimpática, bem como na expressão dos receptores muscarínicos no Grupo I.

	T	S	PS	M1	M2	M3	M4	M5
AD1	↓	NS	↓	↑	NS	NS	NS	NS
AD2	NS	↑	NS	-	-	-	-	-
AE1	NS	↑	NS	↑	NS	NS	↑	NS
AE2	↑	↑	↑	NS	NS	NS	NS	NS
AE3	NS	↑	NS	-	-	-	-	-
FP1	NS	NS	NS	↑	↑	↑	NS	NS
FP2	↑	NS	↑	-	-	-	-	-
FP3	NS	NS	NS	-	-	-	-	-
SIV	↓	NS	↓	-	-	-	-	-

Figura 15 - Quadro resumo dos resultados na análise das fibras nervosas e de subtipos muscarínicos significativamente alterados nos diversos segmentos atriais analisados. S- fibras do sistema nervoso simpático; PS- fibras do sistema nervoso parassimpático; T- total de fibras nervosas; M1 a M5- subtipos de receptores muscarínicos; ↑ - aumento estatisticamente significativo; ↓ redução estatisticamente significativa; NS - não significativo estatisticamente; - corte não examinado.

4. Discussão

O presente estudo, um dos poucos da literatura a analisar simultaneamente vários aspectos morfológicos relacionados à FAP em corações humanos, objetivou descrever e analisar a relação desta arritmia e possíveis alterações anatômicas e micromorfológicas do coração, do sistema nervoso autônomo cardíaco intrínseco simpático e parassimpático e da expressão dos receptores muscarínicos miocárdicos.

Desde as primeiras descrições científicas da FA no século XV, os diversos trabalhos eram feitos de forma a descrever apenas as alterações de pulso ou da ausculta cardíaca. Apenas no início do século XX, Einthoven começou a analisar as ondas de pulsos, juntamente com o novo registro elétrico cardíaco, o eletrocardiograma. Isto permitiu que Hering, em 1903 interpretasse e nomeasse as ondas *f* da atividade atrial durante a FA e um ano após Lewis correlacionasse os achados eletrocardiográficos do ritmo irregular e das alterações hemodinâmicas encontradas na FA^{2,52}. Desde então, a procura definição da fisiopatologia desta arritmia tão prevalente veio despertando a curiosidade de diversos pesquisadores.

Existem evidências suficientes para definir que a FA está diretamente relacionada às reentradas intra-atriais múltiplas e contínuas, tendo seu principal determinante o comprimento de onda elétrica^{2,17}. Este é determinado pelo produto do período refratário e da velocidade de condução, e desta forma, diversos estudos foram elaborados com a finalidade de definir quais fatores poderiam influenciar o período refratário e a velocidade de condução. O presente estudo teve em seus objetivos analisar exatamente os dois fatores morfológicos mais relacionados à iniciação e perpetuação da FA: o substrato, representado nas possíveis alterações anatômicas e micromorfológicas do coração e a modulação autonômica,

representada pelo do SNA cardíaco intrínseco simpático e parassimpático e a expressão dos receptores muscarínicos miocárdicos. Desta forma, num mesmo estudo, foram reunidos os fatores morfológicos definidos como mais importantes na FAP, sendo analisados em corações humanos em uma análise em grupos pareados pela doença cardíaca subjacente.

4.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A SELEÇÃO DA AMOSTRA

Conforme descrito na figura 3, a prevalência de FAP apresentada nos casos de autópsias realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica do InCor/HCFMUSP, foi de 9%. Destes 112 casos de FAP analisados, 13 (11,6%) foram incluídos no estudo para realização da pesquisa. Entretanto, vale salientar a distribuição aleatória da amostra e de que apenas 9 casos (8%) foram descartados por problemas técnicos ou de inconsistência de dados, demonstra uma amostra bastante representativa da população estudada.

Makino *et al*⁴³ descreveram fielmente a presença de conexões entre o ligamento de Marshall e o miocárdio atrial esquerdo, fibras nervosas simpáticas na junção entre o átrio esquerdo e as veias pulmonares, bem como uma maior presença de nervos simpáticos e gânglios parassimpáticos na junção do seio coronariano. Entretanto, como descrito nas limitações do estudo em questão, a presença dos achados encontrados não poderia ser correlacionada com arritmias atriais. A ausência de um grupo controle com corações alterados ou portadores de FA não permitiu uma análise das implicações fisiopatológicas dos achados encontrados.

A decisão de incluir no grupo controle corações com as mesmas doenças cardíacas do grupo referência garantiu fazer uma análise das alterações relacionadas diretamente à arritmia em questão. Isto reduziu uma possível influência das diversas cardiopatias crônicas pareadas entre os grupos nos dados analisados.

As cardiopatias crônicas presentes nos dois grupos estão dentre as principais causas subjacentes à FAP em nosso meio: isquêmica, dilatada valvar, hipertensiva, dilatada idiopática e chagásica, conforme demonstrado na Tabela 2.1. Alterações do substrato miocárdio como fibrose e desconexões miocárdicas comumente relacionadas à FAP poderiam ser estudadas sem a possível interferência das alterações decorrentes da própria doença cardíaca.

A presença de diversas cardiopatias neste estudo se deu pela limitação técnica de se obter casos da mesma cardiopatia em número suficiente de se obter um poder estatístico aceitável. Além disso, esta decisão nos permitiu analisar alterações presentes na FAP em cardiopatias crônicas em geral e não em uma etiologia específica.

4.2 ESCOLHA DOS CORTES ANATÔMICOS A SEREM ESTUDADOS

Os cortes de nove diferentes localizações do coração tiveram o objetivo de aumentar a abrangência segmentar do estudo, permitindo traçar um mapeamento das potenciais alterações que fossem encontradas. Deve-se notar que a localização dos cortes no presente trabalho não foi aleatória.

A parede posterior do átrio (AD1) foi escolhida por ser uma região dos átrios nunca descrita como potencial para geração de *triggers* ou reentradas e desta forma serviria de um controle atrial para as observações realizadas. O istmo cavo-tricuspídeo (AD2) foi analisado por estar relacionado intimamente com o *flutter* atrial.

No átrio esquerdo, foram analisados a porção média do trajeto da VoAe (AE1), definida em diversos trabalhos, em especial o publicado por Makino *et al*⁴³, como um ligamento repleto de inervação cardíaca intrínseca. A junção do átrio esquerdo com a veia pulmonar superior esquerda (AE2) também foi escolhida para análise por diversas evidências, as mais contundentes em relação a este trabalho, em especial Tan *et al*¹⁸ que descreveram descontinuidades e desconexões miocárdicas com possível potencial reentrante e Haïssaguerre *et al*¹⁹⁻²¹ que demonstraram que as veias pulmonares são a principal origem dos focos ectópicos deflagradores da fibrilação atrial em humanos. Estes trabalhos citados justificaram a escolha do AE1 e AE2 para análise da expressão dos receptores muscarínicos. A aurícula esquerda (AE3) foi estudada por sua potencial facilidade de biópsia durante estudos de amostras em casos cirúrgicos, desta forma sendo analisada a reprodutibilidade dos achados dos demais locais neste segmento atrial esquerdo.

Os PG, representados epicardicamente pelos FP, foram demonstrados com maior propriedade por Armour *et al*³³. Assim, foram escolhidos o FP atrial esquerdo superior (FP1) por estar intimamente relacionado com as veias pulmonares superiores, o FP atrial direito posterior (FP2) por estar intimamente relacionado com o nó sinoatrial e o FP atrial esquerdo póstero-medial (FP3) como controle dos demais. Dados recentes sugerem um importante papel da inervação autonômica na fisiopatologia da fibrilação atrial paroxística^{18,21,33,37,38} e que as áreas circunvizinhas das veias pulmonares são importantes vias de inervação pós-ganglionares para o átrio esquerdo³². Durante a análise da expressão dos receptores muscarínicos, devido a esta evidência, foi escolhido o FP1 para análise detalhada.

O septo ventricular (SIV) foi seccionado e estudado em sua porção medial como controle das possíveis alterações estruturais encontrados nos tecidos atriais. Não foi incluída amostra do SIV na análise dos receptores muscarínicos por não haver evidência científica do papel destes na FAP localizados no miocárdio ventricular.

4.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS, ECOCARDIOGRÁFICAS E ANATÔMICAS (DRENAGEM VENOSA DO ÁTRIO ESQUERDO, DIÂMETRO DO ÁTRIO ESQUERDO, SEPTO VENTRICULAR E *FAT-PADS*)

Para este trabalho, foram analisadas as características clínicas e ecocardiográficas clássicas para o desenvolvimento da FAP a fim de reduzir qualquer interferência de fatores de risco já descritos em estudos prévios de maior evidência científica. Os resultados da análise das variáveis clínicas e ecocardiográfica dos pacientes (pré-testes) foram como esperado na literatura, com o aumento do volume do átrio esquerdo no grupo portador de FAP e tendência a um aumento na proporção de pacientes hipertensos nestes mesmos indivíduos. Estes dois dados, conforme descrito anteriormente, são observados como fatores de risco clássicos para FAP em humanos.

Os resultados referentes à drenagem venosa do átrio esquerdo e sua relação com a FAP não demonstraram diferença entre os grupos em nenhuma das análises. Tal informação é importante por não haver estudos anatômicos em cadáveres de seres humanos a respeito desta região na FAP. Apenas um trabalho foi descrito com a mesma técnica utilizada, realizada pelo grupo responsável pelo presente estudo em 2007²³ em 23 corações humanos sem relação com a FAP, demonstrando que há aumento do OSC com o aumento do peso do coração, porém sem aumento da distância da VoAe e o OSC, de cerca de 30mm, distância semelhante à aferida nesta pesquisa (27,7mm).

O aumento do volume do átrio esquerdo, observado no grupo portador de FAP, é uma variável determinante amplamente descrita na literatura.^{1,2,17} O fato de ter sido analisado em corações humanos, procedentes de necrópsia e com o grupo controle também portador de doença cardíaca subjacente aumenta o significado fisiopatológico deste resultado.

Não houve diferença entre o tamanho do FP entre os grupos estudados. São poucos os estudos na literatura que tratam do tema, entretanto Batal *et al*⁵³ em um recente trabalho demonstraram uma relação entre FA e aumento do FP atrial esquerdo através de angiotomografia em humanos. Por um lado, o método anatômico proporciona visão direta da estrutura. Por outro lado, os autores calcularam o volume dos FP, enquanto o presente trabalho limitou-se a uma mensuração unidimensional. Assim, ainda há indefinição sobre esse ponto.

4.4 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DO MIOCÁRDIO ATRIAL E RELAÇÃO COM FIBRILAÇÃO ATRIAL PERMANENTE

A espessura das diversas camadas atriais foi aferida em todos os oito cortes supraventriculares. Foi encontrada uma maior média da espessura do endocárdio nos corações do grupo II, sendo 32% mais espessa que no grupo I e uma tendência desta medida da parede total do átrio ser também maior. Analisando os cortes separadamente, não houve significância estatística, inclusive ao ajustarmos os resultados para as co-variáveis definidas. Isso pode ser explicado pelo fato que nesta região existe uma correlação negativa entre volume do átrio esquerdo e a espessura do endocárdio ($r=-0,47$), indicando que quanto maior o volume menor a espessura. Portanto é possível que a menor média encontrada no grupo FA seja devida ao maior volume do átrio esquerdo neste grupo e não à FA em si.

O único estudo sobre a espessura da parede atrial descrito e com relevância metodológica e estatística foi realizado por Platonov *et al*⁶⁴ que analisaram 298 casos de autópsias em humanos, verificando a espessura da parede posterior do átrio esquerdo em pacientes com e sem FA, apresentando-se mais delgada no primeiro grupo e sua análise corroborando em grande parte os nossos resultados. Porém, neste estudo não foi realizado ajuste para volume do átrio esquerdo.

Diversos trabalhos sugeriram que alterações abruptas da orientação das fibras musculares, interrupções, cruzamentos de fibras e bandas musculares com

encapsulamento fibroso poderiam ser responsáveis por formações reentrantes nas veias pulmonares e nas junções com o átrio esquerdo e consequente perpetuação da FA^{17,39,52}. Também foram encontradas as mesmas alterações na VoAe e na junção com o seio coronariano⁴³. Isso justificou que no presente tenham sido realizadas análises da estrutura das fibras miocárdicas nos diversos segmentos atriais e no septo ventricular, conforme demonstrado na Tabela 3.2. Porém, nossos resultados indicam que tais alterações podem apenas estar presentes independentemente de determinarem ou aumentarem a possibilidade de arritmias reentrantes. Apenas o grupo II, sem FAP, apresentava aumento significativo no percentual de cortes com cruzamento de fibras miocárdicas, indicando uma possível desorganização generalizada do tecido miocárdico atrial em corações doentes, independente desta arritmia estudada. Mais ainda: na subanálise realizada nos cortes separadamente, não houve qualquer significância estatística na amostra, corroborando com a observação de que possivelmente estas alterações não contribuam diretamente com a presença da FAP.

4.5 RELAÇÃO ENTRE FIBROSE ATRIAL E FIBRILAÇÃO ATRIAL PERMANENTE: CAUSA, EFEITO OU NENHUM?

Conforme descrito na Tabela 3.15, não houve diferença estatística entre os grupos analisados quando comparados entre o percentual de área positiva para colágeno nos cortes miocárdicos. Este resultado foi observado tanto quando analisados todos os cortes do coração juntos, como quando separados em cortes atriais (AD1, AD2, AE1, AE2 e AE3) e cortes supraventriculares (AD1, AD2, AE1, AE2, AE3, FP1, FP2 e FP3). Também a mesma ausência de diferenças no colágeno tissular foi observada na análise em todos os cortes separadamente, mesmo quando corrigido para hipertensão arterial e volume do átrio esquerdo.

Embora fosse descrito neste trabalho como fibrose miocárdica, esta é indiretamente indicada pela denominação correta de aumento do colágeno intersticial no miocárdio. O método morfológico mais adequado para seu estudo é a coloração pelo picrossirius (Sirius Red) sob microscopia de polarização, mas foi utilizado o tricrômio de Masson pela facilidade de contraste e resolução da musculatura e depósito de colágeno. Como no coração humano há pouca presença de proteoglicanos, podemos considerar que os resultados obtidos a partir das observações em tricrômio de Masson traduzem de maneira fidedigna a real proporção de colágeno intersticial.

Em 1977, um dos primeiros artigos que descreveram associação entre fibrilação atrial, degeneração celular e fibrose, Thiedemann e Ferrans³⁰ relacionam a FA à fibrose intensa encontrada nos pacientes portadores dessa arritmia, sugerindo

que esta alteração provocaria redução na condução elétrica e o favorecimento de atividade reentrante. No entanto, tal inferência não poderia ser feita em um estudo transversal e observacional e sem grupo controle. Neste mesmo estudo, os autores descrevem que a própria fibrilação atrial e sua contração descoordenada poderia piorar a degeneração do músculo atrial; conceitos que ainda permeiam como dúvidas entre causa e efeito os estudiosos no assunto.

Outros diversos estudos foram realizados após esse descrever esta possível relação. Em 2004, Boldt *et al*⁶⁵ referiram ter realizado o primeiro estudo a demonstrar claramente a relação entre FA em humanos e uma maior expressão de colágeno I, colágeno III e fibronectina. Foram estudados 118 pacientes, com uma amostra tecidual do átrio esquerdo, sendo 30 pacientes com FA paroxística isolada (sem doença cardíaca subjacente), 26 pacientes com FA permanente isolada, 10 pacientes com FA paroxística e miocardiopatia dilatada valvar, 36 pacientes com FAP e miocardiopatia dilatada valvar, 8 pacientes com ritmo sinusal e coração normal e 8 pacientes com ritmo sinusal e miocardiopatia dilatada valvar. Entretanto, a análise realizada através da coloração pelo picrossírius foi apenas descritiva, sem quantificação. Já no presente estudo, em que foi feita a medida, não houve diferença. Além disso, na concentração de colágeno I, analisada no trabalho daqueles autores através de *Western Blot*, entre os grupos com cardiopatia valvar com e sem FAP não houve diferença estatística, assim como entre o grupo com ritmo sinusal sem cardiopatia e o grupo com FA permanente isolada. Adicionalmente, os dados não foram ajustados para os diversos fatores de riscos estatisticamente diferentes nos grupos, como volume do átrio esquerdo e idade. Desta forma, a associação declarada pelos autores baseia-se em observações sem

determinação de causa e efeito, podendo simplesmente a fibrose intersticial acompanhar a evolução da FA, e esta contribuindo para o aumento da própria deposição de colágeno. Em nossos dados, não apresentam qualquer diferença, ou seja, a FAP em corações não está associada a um aumento de fibrose tecidual atrial.

4.6 AVALIAÇÃO DA INERVAÇÃO SIMPÁTICA E PARASSIMPÁTICA DO SISTEMA NERVOSO AUTÔNIMO CARDÍACO INTRÍNSECO NA FIBRILAÇÃO ATRIAL PERMANENTE

Diversos trabalhos na literatura descreveram o SNA cardíaco intrínseco. A partir dos estudos de Armour *et al*³³, Janes *et al*⁶⁶ e Hopkins *et al*⁴¹ esta complexa rede neuronal foi mais claramente descrita. Conforme os trabalhos eletrofisiológicos que se seguiram^{20,34-38}, SNA cardíaco intrínseco é de importante papel no desenvolvimento da FA, demonstrado através de estímulo elétrico ou por injeção de parassimpatomiméticos. Como descrito anteriormente, outros estudos demonstraram que uma alteração do balanço entre a função simpática e parassimpática do SNA está envolvida na iniciação da FA e não somente uma ativação de uma ou outra via³⁵⁻³⁸.

O presente trabalho avaliou a presença da inervação do SNA, classificada como simpática, representada pelas fibras nervosas TH positivas, e a inervação parassimpática, representada pela diferença entre o total de fibras nervosas (S-100 positivas) e as fibras nervosas TH positivas. Foram avaliados 9 cortes nos 26 corações estudados, divididos nos dois grupos já descritos (Tabela 3.15). Foram encontrados dados que sugerem fibras nervosas significativamente com menor relação área/nervo nas áreas estudadas nos casos com FAP que nos corações sem esta arritmia. Nenhuma diferença de concentração da inervação ou da proporção

entre o sistema simpático e parassimpático foi detectada ao analisarmos todos os cortes juntos.

Ao analisarmos os cortes separadamente (Tabela 3.16), observamos que os cortes relacionados aos PG possuem uma quantidade maior de fibras nervosas, como esperado, porém somente o FP2 apresenta uma inervação mais intensa às custas do aumento do número de fibras parassimpáticas nos corações com FAP. O fato do aumento proporcional das fibras nervosas, igualmente aos observados nos FP, é observado no corte AE1, relacionado à VoAe. Em geral, os cortes atriais e do septo ventricular apresentam redução da contagem geral das fibras nervosas (AD1, SIV) com redução das parassimpáticas (AD1, SIV) ou aumento das fibras simpáticas (AD2, AE1, AE2, AE3). No corte AE2, intimamente relacionado à veia pulmonar superior esquerda, ocorre aumento global da inervação nesta área.

Diversos trabalhos^{18,24,42,43} relataram aumento da inervação cardíaca intrínseca em regiões relacionadas eletrofisiologicamente com a FA: as veias pulmonares, o seio coronariano e a VoAe. Seus trabalhos apenas compararam a densidade nervosa simpática ou parassimpática nestas regiões ou nos PG com outras áreas miocárdicas atriais. Entretanto, estas regiões já são descritas como próximas de PG que por definição apresentam maior densidade nervosa, como foi observado neste estudo. A questão que deve ser respondida é se estas regiões estão patologicamente alteradas na FA e se podem ter relação com esta arritmia. A resposta obtida neste trabalho é que uma maior concentração de inervação simpática ou parassimpática nestas regiões pode não estar propriamente relacionada com a FA e que apenas são encontrados potenciais deflagradores desta arritmia nestas áreas pela relação de proximidade com os PG e consequente

ativação do SNA, conforme demonstrado nos estudos eletrofisiológicos^{18,21,33,35,37-40}. Porém, não podemos deixar de analisar as alterações dos achados quanto ao aumento ou redução da inervação simpática ou parassimpática apresenta na FAP em locais pouco estudados, como a parede posterior do átrio direito (AD1), no ventrículo (SIV), na aurícula esquerda (AE3) e no istmo cavo-tricuspídeo (AD2). Em geral, podemos sugerir que alterações na inervação simpática e parassimpática, tanto em termos de quantidade e proporção entre elas (Figura 15).

4.7 EXPRESSÃO DOS DIVERSOS SUBTIPOS DOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS NO MIOCÁRDIO ATRIAL HUMANO E RELAÇÃO COM FIBRILAÇÃO ATRIAL PERMANENTE

Os resultados da análise da expressão dos receptores muscarínicos em diversos pontos do miocárdio atrial demonstraram uma distribuição heterogênea entre os diversos subtipos de receptores. Foram utilizadas técnicas de análise morfométrica computadorizada em imuno-histoquímica que permitem, além de mostrar alterações na expressão dos receptores, observar sua distribuição tecidual e sua localização intracelular. Embora a expressão morfológica dos receptores possa não definir sua função, permite inferir que alterações na sua concentração miocárdio indicam alterações de sua atividade.

Conforme descrito em material e métodos, foram utilizadas diluições supraótimas para cada receptor, permitindo uma discriminação mais sensível da positividade para os anticorpos⁵¹.

A expressão dos receptores M1 revelou-se mais significativamente alterada entre os grupos, conforme demonstrado na Tabela 3.17 e na Figura 11. Todos os cortes demonstraram aumento significativo do receptor, exceto o AE2. A descrição deste aumento de M1 no miocárdio de portadores de FAP é inédita e pode estar diretamente relacionada à FAP e a contribuir na explicação do aumento do tônus simpático reflexo. Como já descrito anteriormente, isto se deve aos efeitos do

M1 através da liberação de catecolaminas nas terminações nervosas simpáticas, tendo efeito estimulatório catecolamina-dependente⁴⁴.

O M2, o receptor muscarínico classicamente mais presente no miocárdio, necessitou de uma maior diluição (1:800) para se obter uma maior distinção entre sua expressão. Também houve diferença estatística aumentada no miocárdio atrial relacionado ao FP1 em corações com FAP, entretanto não foi observada a mesma alteração nos demais cortes. Esta observação seguiu a tendência de haver maior concentração da expressão dos receptores muscarínicos em áreas relacionada ao FP1.

O receptor o subtipo 3 apresentou os mesmos resultados do M2 para uma diluição necessária menor (1:200), sendo observado aumento significativo deste nos cortes FP1 do grupo I, com FAP. Também semelhantemente ao receptor M2, não foi observada a mesma alteração nos demais cortes.

O receptor muscarínico M4 em sua diluição supra-ótima (1:400) demonstrou aumento de sua expressão estatisticamente significativa nos cortes relacionados à VoAe (AE1). Os demais cortes não apresentaram alterações entre os grupos analisados. Assim como os receptores M1 e M2, os M4 já foram descritos em gânglios simpáticos e podem ter ação catecolamino-dependente como confirmado com o receptor subtipo 1. Conforme trabalho publicado por Makino *et al*, a VoAe apresenta um aumento de fibras nervosas simpáticas e gânglios parassimpáticos e pode ter real papel ligado a expressão aumentada destes receptores.

Dentre todos os receptores muscarínicos analisados, o M5 foi o único que não apresentou diferença alguma entre os cortes dos grupos e sua expressão

aparentemente não está relacionado à FAP. Conforme foi descrito nos resultados e demonstrado na Figura 14, aparentemente o receptor muscarínico tipo 5 está intimamente relacionado aos discos intercalares, provocando uma imagem serrilhada nos miócitos. Isto foi descrito por Wang *et al*⁴⁷ em um trabalho que avaliou a expressão dos receptores muscarínicos em quatro corações humanos. Embora não fosse objeto deste estudo, aparentemente não há relação desta observação e a presença da arritmia estudada.

Os resultados sugerem que o tecido miocárdico atrial subjacente a um PG pode estar relacionado com o aumento da expressão dos receptores muscarínicos, com exceção do M5. Isto também aconteceu mais frequentemente com a porção do átrio esquerdo relacionada com a VoAe.

Vale notar que o M2 e o M4 inibem o canal de cálcio, sendo ainda, para o primeiro destes, descritas ações inotrópica e cronotrópica. Assim, seria esperado que estivessem diminuídos, não aumentados, na FAP. O mesmo não se aplica aos receptores M1 e M3, que têm documentados em outros órgãos funções estimulatórias. Pouco se sabe do M5, mas este não mostrou diferenças entre os dois grupos.

Trabalho anterior sugeriu que a heterogeneidade do período refratário poderia ser causada pela distribuição irregular da concentração miocárdica dos receptores muscarínicos subtipo 2¹⁷. Conforme os resultados obtidos, não houve diferenças significativas na variação da percentagem de área positiva nem deste nem dos demais receptores no miocárdio. Isto indica que redução do período refratário global com aumento da heterogeneidade encontradas comumente na FA¹⁷

aparentemente não está relacionada com a variabilidade da distribuição de cada receptor muscarínico.

4.8 REFLEXÕES SOBRE AS LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Algumas limitações deste estudo deverão ser consideradas.

Quanto ao percentual de colágeno intersticial para aferir a fibrose miocárdica, embora o método utilizado neste estudo seja validado, a coloração do picrosírius é mais adequada e celebrada na literatura.

Embora estejam intimamente relacionadas, a inferência da morfologia não necessariamente implica em achados na fisiologia. Desta forma, embora este estudo demonstre alterações da expressão morfológica da maioria dos receptores muscarínicos na FAP, isto pode não necessariamente ser refletido na função, e em alguns casos inclusive ter resultados fisiológicos inversos.

Apesar de ter sido realizado através de análise dos dados realizados após seu início, por ser classificado como um estudo retrospectivo ao analisar casos de necrópsia que já haviam ocorrido, a qualidade das informações dos prontuários e relatórios pode ser colocada em questão. Desta forma, embora tenhamos somente um caso sem a informação das co-morbidades analisadas, um estudo prospectivo seria mais adequado, porém inviável temporalmente.

4.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por se tratar de um trabalho inédito no estudo de todos os subtipos de receptores muscarínicos em corações humanos na FAP, este estudo demonstrou relação entre a expressão de alguns subtipos, em especial o M1, e a presença desta arritmia. Permitiu fazer algumas considerações importantes sobre o papel do SNA na FAP e inclusive questionar a relação causal entre fibrose e possíveis alterações na organização miocárdica estrutural dos átrios e esta arritmia.

Embora os resultados sejam contundentes quanto à expressão miocárdica dos receptores muscarínicos, esta pode não ser correlacionada diretamente à sua função. Trabalhos adicionais quanto à atividade dos receptores muscarínicos em corações humanos poderão ajudar no estudo da fisiopatologia e do tratamento farmacológico da fibrilação atrial permanente.

Finalmente, o desequilíbrio do SNA na FA, já demonstrado em trabalhos experimentais anteriores, pode ser provocado por uma menor atividade da inervação parassimpática e aumento da expressão miocárdica dos receptores muscarínicos, especialmente dos relacionados à atividade catecolamino-dependentes (M1, M2 e M4) em regiões específicas ligadas à FA (M1 e M3); podendo estas alterações estarem relacionadas com a gênese e perpetuação desta arritmia em sua forma permanente em corações humanos

5. Conclusões

Ao final da análise de seus resultados, este estudo pôde concluir as seguintes observações:

1. A anatomia da drenagem venosa do átrio esquerdo e o aspecto macroscópico dos principais FP do coração humano não se apresentam alterados na fibrilação atrial permanente.
2. A fibrose miocárdica não está alterada nos corações portadores de FAP e pode não estar diretamente relacionada à causa da fibrilação atrial permanente.
3. O SNA cardíaco intrínseco representado por suas fibras simpáticas e parassimpáticas apresenta-se alterado numericamente e com fibras nervosas com menor relação área/fibra nos corações com fibrilação atrial permanente.
4. A expressão dos receptores muscarínicos está alterada e pode estar relacionada com a fibrilação atrial permanente. Os receptores subtipo 1 apresentam-se aumentados difusamente e os receptores M2 e M3 estão aumentados em áreas miocárdicas relacionadas aos FP. Os receptores M4 apresentam-se aumentados em áreas relacionadas à VoAe e o M5 não apresenta alterações significativas em sua expressão.

6. Referências

1. Moreira DAR. *Fibrilação atrial*. 2ª ed. São Paulo: Segmento, 2007.
2. Zimmerman LI, Fenelon G, Martinelli Filho M, *et al*. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretrizes Brasileiras de Fibrilação Atrial. *Arq Bras Cardiol*. 2009;92:S1-39.
3. Chen LY, Shen W. Epidemiology of atrial fibrillation: A current perspective. *Heart Rhythm*. 2007;4:S2-6.
4. Sherlag BJ. The re-entry concept as the basis for clinical arrhythmias. *Arch Inst Cardiol Mex*. 1991;61:465-73.
5. Everett TH, Olgin JE. Atrial fibrosis and the mechanisms of atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2007;4:S24-6.
6. Go A, Hylek E, Phillips K, Chang Y, Henault L, Selby J, Singer D. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the Anticoagulation and Risk Factors In Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA*. 2001;285:2370-2375.
7. Bernal O, Moro C. Cardiac Arrhythmias in Women. *Rev Esp Cardiol*. 2006;59:609-18.
8. Feinberg W, Blackshear J, Laupacis A, Kronmal R, Hart R. Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications. *Arch Intern Med*. 1995;155:469-473.

9. Wolf P, Benjamin E, Belanger A, Kannel W, Levy D, D'Agostino R. Secular trends in the prevalence of atrial fibrillation: the Framingham Study. *Am Heart J.* 1996;131:790-795.
10. Benjamin EJ, Levy D, Vasiri SM, D'Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA. Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort: the Framingham Heart Study. *JAMA* 1994; 271:840-4
11. Tsang T, Petty G, Barnes M, *et al.* The prevalence of atrial fibrillation in incident stroke cases and matched population controls in Rochester, Minnesota: changes over three decades. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:93-100.
12. Bialy D, Lehmann MH, Schumacher DN, Steinman RT, Meissner MD. Hospitalization for arrhythmias in the United States: Importance of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19(suppl 3):41A.
13. Kawabata-Yoshihara LA, Benseñor IM, Kawabata VS, Menezes PR, Scazufca M, Lotufo PA. Prevalência de achados eletrocardiográficos no paciente idoso: estudo envelhecimento e saúde de São Paulo. *Arq Bras Cardiol* 2009; 93:651-656.
14. Lin WS, Prakash VS, Tai CT *et al.* Pulmonary vein morphology in patients with paroxysmal atrial fibrillation initiated by ectopic atrial beats originating from the pulmonary veins. Implication for catheter ablation. *Circulation.* 2000;101:1274-1281.

15. Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, *et al.* Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med.* 1998;339:659-66.
16. Atonza F, Jalife J. Reentry and atrial fibrillation. *Heart Rhythm.* 2007;4: S13-6.
17. Kojodjojo P, Peters N, Davies DW, Kanagaratnam P. Characterization of the electroanatomical substrate in human atrial fibrillation: the relationship between changes in atrial volume, refractoriness, wavefront propagation velocities, and AF burden. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2007;18:269-75.
18. Tan AY, Li H, Wachsmann-Hogiu S, Chen LS, Chen P, Fishbein MC. Autonomic innervation and segmental muscular disconnections at the human pulmonary vein-atrial junction. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:132-43.
19. Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, *et al.* Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med.* 1998;339:659-66.
20. Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, *et al.* Right and left atrial radiofrequency catheter therapy of paroxysmal atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1996;7:1132-44.
21. Hocini M, Ho SY, Kawara T, Linnenbank AC, *et al.* Electrical conduction in canine pulmonary veins: electrophysiological and anatomic correlation. *Circulation.* 2002;105:2442-8.

22. Pappone C, Santinelli V, Maguso F, *et al.* Pulmonary vein denervation enhances long-term benefit after circumferential ablation for paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation*. 2004;109:327-34.
23. Oliveira IM, Scanavacca MI, Correia AT, Sosa EA, Aiello VD. Anatomic relations of the Marshall vein: importance for catheterization of the coronary sinus in ablation procedures. *Europace*. 2007;9:915-919.
24. Kim DT, Lai AC, Hwang C, *at al.* The ligament of Marshall: a structural analysis in human hearts with implications for atrial arrhythmias. *J Am Coll of Cardiol*. 2000;36:1324-27.
25. Doshi RN, Wu TJ, Yashima M, Kim YH, Ong JJ, Cao JM, Hwang C, Yashar P, Fishbein MC, Karagueuzian HS, Chen PS. Relation between ligament of Marshall and adrenergic atrial tachyarrhythmia. *Circulation*. 1999;100:876-83.
26. Nguyen BL, Fishbein MC, Chen LS, Chen P, Masroor S. Histopathological substrate for chronic atrial fibrillation in humans. *Heart Rhythm*. 2009;6:454-460.
27. Kourliouros A, Savelieva I, Kiotsekoglou A, Jahangiri M, Camm J. Current concepts in the pathogenesis of atrial fibrillation. *Am Heart J* 2009;157:243-52.
28. Burstein B, Nattel S. Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2007;51:802-809.

29. Allessie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002;54:230-46.
30. Thiedemann KU, Ferrans VJ. Left atrial ultrastructure in mitral valvular disease. *Am J Pathol* 1977;89:575-604.
31. Pimentel Jr, PA. Correlação clínico-histopatológica entre dor e invasão perineural dos carcinomas da cabeça e do pescoço. Paulo Afonso Pimentel Júnior. Niterói, 2004. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Fluminense.
32. Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. 9 Ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan; 1997. O Sistema Nervoso Autônomo; A medulla supra-renal;693-711.
33. Armour JA, Murphy DA, Yuan B, Macdonald S, Hopkins DA. Gross and Microscopic Anatomy of the Human Intrinsic Cardiac Nervous System. *Anatom Rec.* 1997;247:289-98.
34. Hou Y, Sherlag BJ, Jiexiong L, Zhang Y, Lu Z, Truong K, Patterson E, Lazzara R, Jackman WM, Po SS. Ganglionated plexi modulate extrinsic cardiac autonomic nerve input. *J Am Coll Cardiol.* 2007;54:61-8.
35. van den Berg MP, Hassink RJ, Baljé-Volkes C, Crijns HJG. Role of the autonomic nervous system in vagal atrial fibrillation. *Heart.* 2003;89:333-4.

36. Tomita T, Takei M, Saikawa Y, *et al.* Role of autonomic tone in the initiation and termination of paroxysmal atrial fibrillation in patients without structural heart disease. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2003;14:559-64.
37. Ravazi M, Zhang S, Yang D, Sanders RA, Kar B, Delapasse S, Ai T, Moreira W, Olivier B, Khoury DS, Cheng J. Effects of pulmonary vein ablation on regional atrial vagal innervation and vulnerability to atrial fibrillation in dogs. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2005;16:879-84.
38. Sharifov OF, Fedorov VV, Beloshapko GG, Glukhov AV, Yushmanova AV, Rosenshtraukh LV. Roles of adrenergic and cholinergic stimulation in spontaneous atrial fibrillation in dogs. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:483-90.
39. Tan AY, Chen PS, Chen LS, Fishbein MC. Autonomic nerves in pulmonary veins. *Heart Rhythm.* 2007;4:S57-60.
40. Po SS, Sherlag BJ, Yamanashi WS, *et al.* Experimental model for paroxysmal atrial fibrillation arising at the pulmonary vein-atrial junctions. *Heart Rhythm.* 2006;3:201-8.
41. Hopkins DA, Macdonald SE, Murphy DA, Armour JA. Pathology of intrinsic cardiac neurons from ischemic human heart. *Anat Rec.* 2000;259:424-36.
42. Ulphani JS, Arora R, Cain JH, Villuendas R, Shen S, Gordon D, Inderyas F, Harvey LA, Morris A, Goldberger JJ, Kadish AH. The Ligament of Marshall as a parasympathetic conduit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H29-35.

43. Makino M, Inoue S, Matsuyama T, *et al.* Diverse myocardial extension and autonomic innervation on ligament of Marshall in humans. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2006;17:594-599.
44. Hardouin SN, Richmond KN, Zimmerman A, Hamilton SE, Feigl EO, Nathanson NM. Altered cardiovascular responses in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Pharmacol Experiment Therapeut.* 2002; 301:129-37.
45. Caulfield MP, Birdsall NJM. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacol Rev.* 1998;50:279-290.
46. Shi H, Wang H, Li D, Nattel S, Wang Z. Differential alterations of receptor densities of three muscarinic acetylcholine receptor subtypes and current densities of the corresponding K⁺ channels in canine atria with atrial fibrillation induced by experimental congestive heart failure. *Cell Physiol Biochem.* 2004;14:31-40.
47. Wang H, Han H, Zhang L *et al.* Expression of multiple subtypes of muscarinic receptors and cellular distribution in the human heart. *Mol Pharmacol.* 2001;59:1029-1036.
48. Soares PP, Porto CS, Abdalia FM, *et al.* Effects of rat sinoaortic denervation on the vagal responsiveness and expression of muscarinic acetylcholine receptors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006; 47:331-6.

49. Dutra, OP. II Diretriz Brasileira de Cardiopatia Grave. *Arq. Bras. Cardiol.* 2006;87(2):223-232.
50. Rodrigues SL, Pimentel EB, Mill JG. Peso dos ventrículos cardíacos determinado em necropsia de indivíduos saudáveis mortos por causas externas. *Arq. Bras. Cardiol.* 2007;89(5):279-284.
51. Aiello VD, Higuchi ML, Lopes EA, Lopes AAB, Barbero-Marcial M, Ebaid M. An immunohistochemical study of arterial lesions due to pulmonary hypertension in patients with congenital heart defects. *Cardiol Young.* 1994;4:37-43.
52. Pimenta J, Moreira JM. A história da fibrilação atrial. In: Moreira DAR. *Fibrilação Atrial*, Lemos Editorial, São Paulo, 2003, 11-29.
53. Batal O, Schoenhagen P, Shao M, *et al.* Left atrial epicardial adiposity and atrial fibrillation (abstract). *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2010;3:230-236.
54. Platonov PG, Ivanov V, Ho SY, Mitrofanova L. Left atrial posterior wall thickness in patients with and without atrial fibrillation: data from 298 consecutive autopsies. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2008;19:689-92.
55. Boldt A, Wetzel U, Lauschke J, *et al.* Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *Heart.* 2004;90:400-405.

56. Janes RD, Brandys JC, Hopkins DA, Johnstone DE, Murphy DA, Armour JA. Anatomy of human intrinsic cardiac nerves and ganglia. *Am J Cardiol.* 1986;57:299-309.

7. Anexos

ANEXO I - FICHA DO CORAÇÃO

FICHA DO CORAÇÃO – MACROSCOPIA

Nº da Ficha: _____

GRUPO: _____

Necropsia Nº: _____/_____/_____

Data da necropsia: ____/____/20____

Portador de FA Crônica? Sim Não

Tempo aprox: ____ meses / indeterminado

Nome: _____ Pront: _____

Idade: _____ anos Sexo: M F Peso: _____ Kg Altura: _____ m

Co-morbidades: HAS DM AVC prévio Outro: _____

Ecocardiograma: AE: ____mm Septo IV: ____mm FE: _____%

Insuficiência diastólica: _____ Data: ____/____/20____

Doença Principal (laudo da necrópsia): _____

Medidas:

Peso do Coração: _____g

Diâmetro do OSC: _____mm

Diâmetro do óstio da VoAe: _____mm

Não visualizada

Distância entre o OSC e a VoAe: _____mm

Diâmetro do seio coronário na drenagem da VoAe: _____mm

Distância entre a válvula de Vieussens e o OSC : _____mm

1 cuspide / 2 cuspides / Não visualizada

Diâmetro longitudinal do AE: _____mm

Diâmetro transversal do AE: _____mm

SIV: Septo IV: ____mm

AE1: Trajeto médio da VM

AE2: Junção veia pulmonar superior esquerda

AE3: Aurícula E

Visualização dos FP:

FP 1: Veia pulmonar superior esquerda-átrio:_____mm

Não-visualizado

FP 2: Junção da veia pulmonar superior direita-nó sinoatrial:_____mm

Não-visualizado

FP 3: Junção da veia cava inferior-átrios:_____mm

Não-visualizado

APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR/HCFMUSP



Mem. CC. 1273



São Paulo, 20 de setembro de 2007.

Ao
Dr. Paulo Sampaio Gutierrez

Ref.: Protocolo de Pesquisa SDC 3043/07/118

A Comissão Científica do Instituto do Coração, **APROVOU** na sessão 522/07/14 de 20.09.2007, o Protocolo de Pesquisa SDC 3043/07/118 **“Implicações do Sistema Nervoso Autônomo Cardíaco e Células Tipo-Cajal na Fibrilação Atrial Crônica”**.

Aguardar aprovação da CAPPesq e do financiamento para iniciar o estudo. Solicitamos nos enviar cópia da aprovação dos recursos solicitados à agência de fomento, assim que possível. Caso o financiamento não seja aprovado ou não tenhamos recebido a carta de aprovação após o prazo de 120 dias, o pesquisador será convocado pela Comissão Científica para justificar-se.

Atenciosamente,

Selma C. Quiaia Fortunato
Secretária da Comissão Científica
InCor - HC.FMUSP

Obs.: Lembramos que de acordo com a Res. 196 de 10/10/96, incisos IX.1 e 2, a responsabilidade do pesquisador é indelegável, indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais e cabe ao pesquisador apresentar o protocolo, devidamente instruído ao CEP, aguardando o pronunciamento deste, antes de iniciar a pesquisa.

APROVAÇÃO DA CAPPESQ



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 30/01/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0890/07**, intitulado: "**IMPLICAÇÕES DO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO CARDÍACO E CÉLULAS TIPO-CAJAL NA FIBRILAÇÃO ATRIAL CRÔNICA.**" apresentado pelo Departamento de **Comissão Científica do Incor.**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Paulo Sampaio Gutierrez**

Pesquisador (a) Executante: **Ítalo Martins de Oliveira**

CAPPesq, 12 de Fevereiro de 2008

R. Lima
COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
14 / 02 / 2008

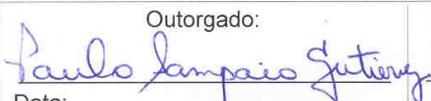
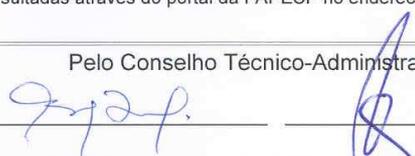
Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão de
Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403

010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br /

secretariacappesq2@hcnet.usp.br

**FINANCIAMENTO DA FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE
SÃO PAULO – FAPESP**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO	
ADITIVO AO TERMO DE OUTORGA E ACEITACAO DE AUXÍLIO PROCESSO Nº 2007/56648-8	
O Conselho Técnico-Administrativo da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, doravante denominada OUTORGANTE , resolveu alterar o Termo de Outorga inicial conforme segue, mantidas as "Condições Gerais de Concessão de Benefícios" do Termo de Outorga inicial.	
OUTORGADO PAULO SAMPAIO GUTIERREZ CPF: 006.584.868-37	
INSTITUIÇÃO 04 013 035 - INST CORACAO/SSSP	
LINHA DE FOMENTO AUXILIO PESQUISA - REGULAR	
PROJETO IDENTIFICACAO E CARACTERIZACAO DA INERVACAO AUTONOMICA ATRIAL E SUAS IMPLICACOES NA FIBRILACAO ATRIAL.	
ÁREA 04010000 - MEDICINA	PERÍODO 01/03/2008 a 31/08/2010
RELATÓRIOS CIENTÍFICOS ATÉ: 28/02/2009 30/08/2009 30/09/2010	PRESTAÇÃO DE CONTAS ATÉ: 30/03/2009 30/08/2009 30/09/2010
<p align="center">OBSERVAÇÕES</p> <ul style="list-style-type: none"> - Qualquer alteracao na destinacao dos recursos concedidos, inclusive a utilizacao de saldos resultantes de diferenca entre os precos previstos no projeto e os precos efetivamente pagos, deve ser previamente autorizada pela Outorgante. - Material de consumo (se houver): Caso sejam adquiridos materiais que nao sejam manifestamente necessarios a realizacao deste projeto, a Outorgante podera impugnar as despesas correspondentes na prestacao de contas. - Imediatamente apos a apresentacao do relatorio cientifico estabelecido pela FAPESP como relatorio final, o saldo acaso existente sera automaticamente cancelado. - O Outorgado reconhece que o auxilio concedido, nos termos aqui descritos, viabilizam plenamente a execucao do projeto, salvo circunstancias imprevisiveis no ato da assinatura. Solicitacoes de qualquer alteracao de orcamento, exceto em casos emergenciais, poderao ser apresentadas por ocasio da apresentacao do(s) relatorio(s) cientifico(s). - A aquisicao de material radioativo, nacional ou importado, fica condicionada a entrega a FAPESP do comprovante de registro do Outorgado e da Instituicao na CNEN. - As instrucoes para a prestacao de contas deverao ser consultadas atraves do portal da FAPESP no endereco: www.fapesp.br/formularios. 	
Outorgado: 	Pelo Conselho Técnico-Administrativo: 
Data:	

NORMAS ADOTADAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Apresentação de originais: NB -1139. Rio de Janeiro, 2000.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE - nº. 01/88: Normas de pesquisas em saúde. Bioética. 1955;3:137-54.

DeCS – Descritores em Ciências de Saúde. 3ª. ed. São Paulo. Bireme; 1992.

UNIFORM REQUIREMENTS FOR MANUSCRIPTS SUBMITTED TO BIOMEDICAL JOURNALS. INTERNATIONAL COMMITTEE OF MEDICAL EDITORS. Ann Intern Med. 1997;126:36-47. Disponível em www.icmje.org.

FEDERATIVE COMMITTEE ON ANATOMICAL TERMINOLOGY. Terminologia Anatômica, [Tradução para o Português por CTA-SBA]. São Paulo, Manole, 2001, 248p.

Inmetro - UNIDADES LEGAIS DE MEDIDA. Disponível em www.inmetro.gov.br/consumidor/unidlegaismed.asp

Universidade de São Paulo. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP Parte IV (Vancouver). São Paulo:Sistema Integrado de Bibliotecas da USP;2009.96p

DADOS BRUTOS – MÉDIAS POR CORTE