

EVILÁSIO LEOBINO DA SILVA JÚNIOR

**Expressão de receptores adrenérgicos do sistema nervoso
autônomo e dos marcadores de células tipo-Cajal na
fibrilação atrial permanente humana**

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
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva Júnior, Evilásio Leobino da

Expressão de receptores adrenérgicos do sistema nervoso autônomo e dos
marcadores de células tipo-Cajal na fibrilação atrial permanente humana /
Evilásio Leobino da Silva Júnior. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.

Orientador: Paulo Sampaio Gutierrez.

Descritores: 1.Fibrilação atrial 2.Sistema nervoso autônomo 3.Receptores
adrenérgicos 4.Células intersticiais de Cajal 5.Imuno-histoquímica 6.Patologia
7.Humanos

USP/FM/DBD-283/15

A Deus, por sempre me guiar nas horas difíceis, onde quer que eu esteja, principalmente nos momentos de dúvidas e que ameacei desistir.

À minha amada esposa, Carla Sanford Rangel Xerez Leobino, presente de Deus, pelo amor, pela dedicação, pelo apoio, pelo estímulo e pela compreensão, com quem eu aprendi a somar, compartilhar e dividir. Você foi incansável durante este processo. Agradeço por me fazer, diariamente, uma pessoa mais feliz. Com você, me sinto mais perto de Deus.

À minha querida filha, Suzana Maria Xerez Leobino, meiga, intensa e apaixonante, cedo despertou o melhor de mim. É realmente um presente de Deus para toda minha vida.

Ao meu pai, Evilasio Leobino da Silva, por ter me mostrado, do seu jeito, o caminho certo para as coisas. Sempre foi e sempre será um grande exemplo de caráter e bondade.

À minha querida mãe, Maria do Amparo Leobino da Silva, por tudo que fez e ainda faz por mim, com tanto amor e carinho. O seu exemplo de força e perseverança diante de todas as dificuldades que passamos juntos permitiu-me acesso aos estudos e ensinou-me como não desistir nunca.

Aos meus irmãos, Evilane (in memoriam), Eveline, Everton, Evelise, Ellen e Evilasio Neto, por terem compartilhado comigo tempos preciosos de suas vidas. Especialmente pelas intermináveis risadas. Os admiro tanto quanto me admiram.

Aos meus sogros, Dr. Raimundo Tadeu Dias Xerez e Vera Lúcia Rangel Xerez, por terem me adotado como parte de sua família com muito amor e carinho.

*À D. Suzana Sanford Rangel, uma pessoa doce e meiga.
Obrigado pelo carinho e amor.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

“Aclamai a Deus, toda a terra, Cantai glória de seu nome, Rendei-lhe glorioso louvor. Dizei a Deus: Vossas obras são estupendas! Tal é o vosso poder que os próprios inimigos vos glorificam” (Salmo 66).

Em especial, ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Sampaio Gutierrez, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transmite sabedoria, competência e inteligência; o meu respeito e a minha admiração pela sua seriedade e pelo apoio na realização dessa tese.

Ao amigo, Dr. Italo Martins de Oliveira, pela paciência, pela dedicação, pelo incentivo e pelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa. Certamente, não teria conseguido sem a sua ajuda.

À Dra. Zenaide, pelo acolhimento, desde do momento em que cheguei a São Paulo para a residência, assumindo o papel de mãe, orientando, apoiando, incentivando e cobrando quando necessário. Sua generosidade em compartilhar suas notáveis habilidades médicas e humanas, que foram essenciais para ampliar meus horizontes e consolidar minha formação.

Aos mestres e amigos, Dr. Silas Galvão Filho e Dr. Jose Tarcísio Medeiros de Vasconcelos, pelos ensinamentos iniciais e fundamentais para minha formação como eletrofisiologista e estimulista, e pelo incentivo para o desenvolvimento dessa tese. Tenho vocês como exemplos de pessoas e de profissionais.

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

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 por todo o trabalho desenvolvido neste projeto.

Aos companheiros e amigos de pós-graduação, que fizeram parte da família DINTER, que, durante esses, permaneceram unidos pelo incentivo, pela amizade, pelo intenso intercâmbio de ideias, pela cooperação científica e pela colaboração nas análises dessa tese.

À minha esposa por compartilhar tão intensamente nossas vidas, pelo o amor, carinho, dedicação, apoio incansável, exemplo de perseverança, força, cuidado e compreensão. Ao longo da realização desta tese celebramos a maior alegria das nossas vidas, a chegada da pequena Suzana e enfrentamos juntos todos os desafios. Sua capacidade de entrega, incentivo e prontidão em colaborar, permitiram o equilíbrio essencial para a realização desta tese.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana seja apenas outra alma humana”.

Carl G. Jung

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com Lista *of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADRO

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Revisão da literatura.....	2
1.1.1 Definição e história.....	3
1.1.2 Epidemiologia.....	3
1.1.3 Patogenia.....	5
1.1.4 Causas.....	6
1.1.5 Classificação.....	7
2 PARTE I – RECEPTORES ADRENÉRGICOS.....	10
2.1 Introdução.....	10
2.1.1 O papel do sistema nervoso autônomo na FA.....	10
2.1.2 Receptores adrenérgicos.....	13
2.2 Objetivo.....	15
2.3 Casuística e Método.....	15
2.3.1 Definição e desenho do estudo.....	15
2.3.2 Critérios de inclusão.....	15
2.3.3 Critérios de exclusão.....	16
2.3.4 Dados dos pacientes.....	17
2.3.5 Amostragem dos corações.....	18
2.3.6 Processamento histológico.....	18
2.3.7 Técnica de imuno-histoquímica.....	19
2.3.8 Quantificação dos receptores adrenérgicos.....	20
2.3.9 Análise estatística.....	22
2.3.10 Aspectos éticos.....	22
2.3.11 Financiamento.....	23

2.4 Resultados	23
2.5 Discussão	31
2.5.1 Considerações sobre a seleção da amostra	31
2.5.2 Expressão dos diversos subtipos dos receptores adrenérgicos no miocárdio atrial humano e relação com fibrilação atrial permanente	32
3 PARTE II – CÉLULAS INTERSTICIAIS TIPO-CAJAL	35
3.1 Introdução	35
3.1.1 Células intersticiais do tipo-Cajal	35
3.2 Objetivo	36
3.3 Casuística e método	37
3.3.1 Definição e desenho do estudo	37
3.3.2 Critérios de inclusão	37
3.3.3 Critérios de exclusão	38
3.3.4 Dados dos pacientes	38
3.3.5 Amostragem dos corações	39
3.3.6 Processamento histológico	39
3.3.7 Técnica de imuno-histoquímica	40
3.3.8 Quantificação das células tipo-Cajal	41
3.3.9 Análise estatística	43
3.3.10 Aspectos éticos	43
3.3.11 Financiamento	43
3.4 Resultados	44
3.5 Discussão	44
3.5.1 Reflexões sobre as limitações do estudo	47
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
5 CONCLUSÕES	51
6 ANEXOS	53
6.1 Anexo A – Aprovação da Comissão de Ética Médica	53
7 REFERÊNCIAS	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AE	Átrio Esquerdo
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclica
ATP	Trifosfato de Adenosina
AV	Atrioventricular
BSA	Albumina de Soro Bovino
CIA	Comunicação Interatrial
CIC	Células Intersticiais de Cajal
CITC	Células Intersticiais Tipo-Cajal
CVE	Cardioversão
DAB	Diaminobenzidina
DAC	Doença Arterial Coronária
dp	Desvio Padrão
ECG	Eletrocardiograma
FA	Fibrilação Atrial
FAP	Fibrilação Atrial Permanente
FP	<i>Fat-Pads</i>
Gi	Atividade Inibitória
GMP	Monofosfato de Guanosina
Gs	Atividade Estimulatória
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
IC	Insuficiência Cardíaca
Incor/FMUSP	Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
PG	Plexos Ganglionares
SM	Síndrome Metabólica
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SUS	Sistema Único de Saúde

VCI	Veia Cava Inferior
VCS	Veia Cava Superior
VD	Ventrículo Direito
VE	Ventrículo Esquerdo
VFC	Variabilidade da Frequência Cardíaca
VoAE	Veia Oblíqua do Átrio Esquerdo
VP	Veias Pulmonares

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho do aspecto posterior de um coração humano e os plexos ganglionares (amarelo).....	11
Figura 2	Desenho do aspecto superior do coração humano e os plexos ganglionares (amarelo).....	12
Figura 3	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.....	21
Figura 4	Desenho esquemático do método utilizado na leitura das lâminas para os receptores adrenérgicos	22
Figura 5	Foto utilizando o sistema de análise de imagens Axiovision 4.6 (Carl Zeiss, Alemanha), acoplado a microscópio Axio imager A1 da mesma marca.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparações entre os grupos em relação às características demográficas e clínicas dos pacientes.	17
Tabela 2	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo β_1	24
Tabela 3	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo 1 (β_1) em pacientes em uso de β -bloqueador.....	24
Tabela 4	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo 1 (β_1) em pacientes sem β -bloqueador.....	25
Tabela 5	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo 1 (β_1) em relação ao uso de β -bloqueador.....	25
Tabela 6	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo β_2	25
Tabela 7	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo 2 (β_2) em pacientes em uso de β -bloqueador.....	26
Tabela 8	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo 2 (β_2) em pacientes sem β -bloqueador.....	26
Tabela 9	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo 2 (β_2) em relação ao uso de β -bloqueador.....	27
Tabela 10	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo β_3	27
Tabela 11	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo 3 (β_3) em pacientes em uso de β -bloqueador.....	28
Tabela 12	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo 3 (β_3) em pacientes sem β -bloqueador.....	28

Tabela 13	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo 3 (β 3) em relação ao uso de β -bloqueador.....	29
Tabela 14	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos GRK5.....	29
Tabela 15	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos GRK5 em pacientes em uso de β -bloqueador.....	30
Tabela 16	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos GRK5 em pacientes sem β -bloqueador.....	30
Tabela 17	Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos GRK5 em relação ao uso de β -bloqueador.....	31
Tabela 18	Comparações entre os grupos em relação às características demográficas e clínicas dos pacientes	39
Tabela 19	Comparações entre os grupos em relação ao número de células positivas para CITC	44

LISTA DE QUADRO

Quadro 1	Condições associadas à fibrilação atrial.....	6
-----------------	---	---

RESUMO

Silva Júnior EL. *Expressão de receptores adrenérgicos do sistema nervoso autônomo e dos marcadores de células tipo-Cajal na fibrilação atrial permanente humana* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A fibrilação atrial (FA) é a arritmia cardíaca mais comum na prática clínica e que apresenta a maior morbidade, principalmente com o avançar da idade. O sistema nervoso autonômico, particularmente o balanço adrenérgico/colinérgico, tem profunda influência na ocorrência de fibrilação atrial. A FA pode ser gerada e mantida por uma variedade de mecanismos eletrofisiológicos e uma mudança na atividade autonômica poderá afetar cada um deles de forma diferente. Além do sistema nervoso autônomo, simpático e parassimpático, envolvidos na gênese e manutenção da FA, já é sabido que existem vários outros fatores envolvidos e, dentre eles, as células intersticiais tipo-Cajal (CITC), semelhantes às células intersticiais que contribuem para a atividade motora peristáltica do trato gastrointestinal. Essas células foram encontradas no miocárdio atrial e ventricular, e poderiam ser a origem da atividade deflagradora de focos elétricos ectópicos geradores de FA. O presente estudo teve como objetivos analisar possíveis alterações na expressão miocárdica dos receptores β -adrenérgicos e quantificar as células intersticiais tipo-Cajal nos átrios de corações humanos, em particular, no esquerdo, e sua relação com a fibrilação atrial permanente (FAP). Para o primeiro objetivo, foram estudados 19 casos de corações de autópsias de portadores de FAP e cardiopatia crônica definida (grupo I), e 19 corações pareados com as mesmas cardiopatias, porém sem evidências de qualquer arritmia supraventricular (grupo II). Foram ressecadas uma amostra no teto do átrio direito, duas no átrio esquerdo, e uma em terminação nervosa envolvida em tecido gorduroso no epicárdio do átrio esquerdo (*fat-pad*). A expressão miocárdica dos receptores β -adrenérgicos 1 a 3 e da quinase-5 do receptor adrenérgico acoplado à proteína G (GRK5) foi avaliada pela proporção positiva no miocárdio nos cortes citados. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos quando analisamos a expressão dos receptores adrenérgicos (β -1, β -2, β -3 e GRK5), independentemente do uso ou não de β -bloqueador. Para o segundo objetivo, foram estudados 6 casos de corações de autópsias de portadores de FAP e cardiopatia crônica definida (grupo I), e 6 corações pareados com as mesmas cardiopatias, porém sem evidências de qualquer arritmia supraventricular (grupo II). As CITC foram avaliadas na região média da parede diafragmática do átrio esquerdo. Não houve alterações estatisticamente significantes entre os grupos estudados, quando avaliamos o número de células positivas no miocárdio pela área do miocárdio em mm², o número de células positivas no corte inteiro pela área do miocárdio em

mm² ou o número de células positivas no corte inteiro/área do corte inteiro em mm², seja em relação a cada corte individualmente, ao átrio esquerdo isoladamente e a todos os cortes juntos. Em conclusão, nem alterações na expressão de receptores beta-adrenérgicos nem a presença de células tipo-Cajal parecem ter maior papel na patogênese da fibrilação atrial permanente.

Descritores: Fibrilação atrial; Sistema Nervoso Autônomo; Receptores Adrenérgicos; Células Intersticiais de Cajal; Imuno-histoquímica; Patologia; Humano.

SUMMARY

Silva Júnior EL. *Expression of autonomic nervous system adrenergic receptors and markers of interstitial Cajal-like cells in human permanent atrial fibrillation* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Atrial fibrillation (AF) is the most common cardiac arrhythmia in clinical practice, presenting the highest morbidity, especially with advancing age. The autonomic nervous system, particularly the adrenergic/cholinergic balance, has a profound influence on the occurrence of AF. AF can be generated and maintained through a variety of electrophysiological mechanisms, and a change in autonomic activity may affect each of mechanism differently. In addition to the autonomous, sympathetic, and parasympathetic nervous systems involved in the genesis and maintenance of AF, there are several other factors known to be involved, including the interstitial cells of Cajal (ICCs), similar to the interstitial cells that contribute to the peristaltic motor activity of the gastrointestinal tract. These cells were found in the atrial and ventricular myocardium, and could be the source of the triggering activity of ectopic electrical foci that generate AF. In the present study, we aimed to analyze the possible changes in the myocardial expression of β -adrenergic receptors and to quantify ICCs in the atria of human hearts, in particular in the left atrium, and its relation with permanent AF (PAF). For the first objective, we studied 19 hearts from autopsies of patients with PAF and defined chronic cardiomyopathy (group I), and 19 paired hearts with the same cardiomyopathy but without evidence of any supraventricular arrhythmia (group II). A tissue sample from the ceiling of the right atrium, two from the left atrium, and one from the nerve ending involved in the adipose tissue in the epicardium of the left atrium (fat pad) were resected. The myocardial expression of β -adrenergic receptors 1 and 3, and of the G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5) was assessed according to the positive proportion in the myocardium in the mentioned sections. There was no statistically significant difference between the two groups in the expression of adrenergic receptors (β -1, β -2, β -3, and GRK5), regardless of the use or nonuse of β -blockers. For the second objective, six hearts from autopsied patients with PAF and defined chronic cardiopathy (group I) were studied, along with six paired hearts with the same cardiopathies but without evidence of any supraventricular arrhythmia (group II). The ICCs were evaluated in the middle region of the diaphragmatic wall of the left atrium. There were no statistically significant changes between the groups when we evaluated the number of positive cells in the myocardium by area of the myocardium in mm^2 , the number of positive cells in the full section by area of the myocardium in mm^2 , or the number of positive cells in the full section/area of the full section in mm^2 , be it in relation to each section

individually, the left atrium alone, or all sections together. In conclusion, neither changes in the expression of β -adrenergic receptors nor the presence of ICCs seem to have a large role in the pathogenesis of permanent AF.

Descriptors: Atrial fibrillation; Autonomic nervous system; Adrenergic receptors; Interstitial cells of Cajal; Immunohistochemistry; Pathology; Human.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as arritmias com implicações clínicas e que necessitem de tratamento específico, a fibrilação atrial (FA) é a mais frequente e com maior morbidade. Em todos os países, a prevalência da FA dobra a cada aumento de década, a ponto de cerca de 8% a 10% dos pacientes que têm 80 anos venham a apresentar FA¹, especialmente os do sexo masculino. Entretanto, a incidência desta arritmia não aumenta progressivamente só com a idade, mas também com a sobrevivência cada vez maior de indivíduos com cardiopatias diversas².

A FA é dinâmica e quase sempre associada a outras comorbidades clínicas, em especial: hipertensão arterial sistêmica (HAS), doença arterial coronária (DAC), doença valvar, principalmente mitral, insuficiência cardíaca (IC), síndrome metabólica (SM), incluindo obesidade e apneia do sono. Além disso, sabemos que a FA pode provocar IC e vice-versa, e ambas aumentam sua incidência e prevalência com a idade. O risco relativo de fibrilação atrial se desenvolver em pacientes com insuficiência cardíaca, no estudo de Framingham, foi de 4,5 e 5,9 em homens e mulheres, respectivamente³. De todos os homens que desenvolveram FA em 38 anos de seguimento, 20% tinham IC congestiva no início do estudo. Middlekauff *et al.* relataram uma prevalência de 15% a 30% de FA em pacientes com IC⁴. Percebe-se, portanto, que o contínuo aumento das proporções de idosos, que se observa nas sociedades mais desenvolvidas, é um fator propício para que a incidência destas duas entidades clínicas continue aumentando, uma alimentando a incidência da outra.

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 Definição e história

A fibrilação atrial é definida como uma taquiarritmia supraventricular não dependente do nódulo atrioventricular (AV), caracterizada por ativação atrial caótica, não coordenada e com conseqüente deterioração da função mecânica atrial. Essa ativação atrial desorganizada é transmitida para os ventrículos de forma irregular, provocando respostas ventriculares irregulares e que são rápidas quando a condução AV está intacta. A magnitude da resposta ventricular dependerá das propriedades eletrofisiológicas do nódulo AV e de outros tecidos de condução, do tônus vagal e simpático, da presença ou não de vias acessórias e da ação de drogas⁵.

O eletrocardiograma (ECG) caracteriza-se por rápidas oscilações ou ondas fibrilatórias que variam em amplitude, forma e frequência, e que substituem as ondas “P”^{5,6}.

A descrição citada como a mais antiga de FA é a do médico imperador que viveu na China no período de 1696 a 1598 a.C., Huang Ti Nei Ching Su Wen, colhida da obra *The Yellow Emperor’s Classic of Internal Medicine*⁷. Porém, cientificamente, a FA começa a ser conhecida a partir do século XV, inicialmente como “Palpitações revoltosas” e, posteriormente, como *delirium cordis* e *pulsus irregularis perpetuus*⁸, observando-se que sempre o pulso irregular fora associado à doença valvar mitral e à falência cardíaca.

1.1.2 Epidemiologia

A FA é a arritmia sustentada mais comum na prática clínica. Sua prevalência na população geral oscila entre 0,4% e 1%, aumentando proporcionalmente com a idade, de modo que cerca 8% das pessoas aos 80 anos apresentam essa arritmia⁹. A relação entre idade avançada e fibrilação

atrial se dá particularmente pelo maior desarranjo estrutural, histológico e elétrico do miocárdio atrial, que predispõe à condução lenta e ao bloqueio unidirecional do impulso elétrico, facilitando a reentrada, o que gera a FA³. Além disso, a idade avançada, frequentemente, está associada à hipertensão arterial e/ou insuficiência coronariana, aumentando a instabilidade atrial, com surgimento de arritmias atriais, sejam ectopias sejam taquicardias atriais, levando ao remodelamento elétrico no átrio resultando em FA³. Aproximadamente um terço das internações por arritmia tem como causa a FA¹⁰. Apenas nos Estados Unidos e na União Europeia, avalia-se a existência de 2,2 milhões e 4,5 milhões de pessoas acometidas por essa doença, respectivamente⁹. No Brasil, estimam-se cerca 1,5 milhões de pessoas com FA⁶, constituindo-se na quinta principal causa de internação hospitalar no Sistema Único de Saúde (SUS)¹¹. Caso a incidência desta arritmia se mantenha nas taxas atuais, estima-se que, em 2050, existirão, aproximadamente, 16 milhões de norte-americanos afetados por essa enfermidade¹².

A incidência da FA é menor que 1% até a idade 60 anos, chegando a 3% a 5% entre 60 e 65 anos e a 10% em pacientes da faixa etária dos 80 anos. 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 igualarem³. Outro estudo ainda demonstrou uma maior prevalência em mulheres idosas, com 60% dos casos em pacientes acima de 75 anos¹³.

A epidemiologia da FA é importante devido a sua alta morbidade e mortalidade. Esta arritmia está relacionada com um risco 5 vezes maior de eventos tromboembólicos, tendo como sua principal complicação o AVC e 4 vezes de insuficiência cardíaca com conseqüente maior mortalidade; além de estar relacionada com o aumento dos distúrbios da cognição e do índice de internações¹⁴.

1.1.3 Patogenia

A FA é uma arritmia complexa, diversa e que deriva de eventos deflagradores, perpetuadores, facilitadores e predisponentes. A sequência destes eventos é difícil de determinar e pode variar de acordo com as diversas etiologias e formas clínicas da arritmia. Na década de 90, a fisiopatologia da FA baseia-se em reentradas intra-atriais múltiplas e contínuas⁵. Em 1997, Haisaguerre *et al.* descreveram, pela primeira vez, o início da FA paroxística causada por foco ectópico disparando em áreas focais procedente do interior das veias pulmonares (VP)¹⁵. 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*)^{16,17}. Alterações no substrato miocárdico susceptível seriam os responsáveis pela manutenção do ritmo caótico^{18,19}. Embora a fibrose tenha sido considerada por muitos autores como associada pela heterogeneidade da condução^{20,21}, estudos mais recentes vêm mostrando que ela não é maior que a encontrada nas mesmas doenças em pacientes sem FA^{22,23}. Os dados de Oliveira *et al.* indicam, ainda, que a anatomia e a disposição das fibras musculares atriais, também consideradas anteriormente como ligadas a essa arritmia, não parecem estar relacionadas à fibrilação atrial permanente (FAP) nos grupos estudados²⁴.

A ablação das bandas musculares no interior das veias pulmonares com radiofrequência ou seu isolamento empírico controla 70% dos pacientes com FA paroxística²⁵. Entretanto, 20% a 30% dos pacientes continuam com recorrência, possivelmente com origem fora das veias pulmonares²⁵. A parede posterior do átrio esquerdo, a veia cava superior, seio coronário, a crista *terminalis* e o ligamento de Marshall podem também estar envolvidos neste processo^{19,26,27}.

1.1.4 Causas

Doenças cardíacas podem causar fibrilação atrial devido à formação do substrato arritmogênico que gera e mantém a arritmia. O aumento do tamanho dos átrios, particularmente o átrio esquerdo (AE), secundariamente à HAS, por exemplo, aumenta o risco de surgimento da arritmia por aumentar a quantidade de tecido para acomodar o circuito reentrante. Já se demonstrou que, para que a FA se mantenha, é necessária uma quantidade de massa atrial²⁸. As condições a seguir, expostas no Quadro 1, concomitantes podem provocar ou facilitar a progressão da FA, e devem ser registradas e tratadas adequadamente:

Quadro 1 - Condições associadas à fibrilação atrial

Causas Cardíacas	Causas Extracardíacas
Valvulopatia mitral	Consumo de álcool
Hipertensão arterial sistêmica*	Dispepsia
Disfunção sinusal	Envelhecimento (apoptose)
Cardiopatía congênita (CIA)	Idiopática
Insuficiência cardíaca	Tireotoxicose
Cardiomiopatia	Prática de esporte
Miocardites	Apneia do sono*
Pós-operatório de cirurgia cardíaca	Obesidade*
Síndrome de Wolff-Parkinson-White	Diabetes*
Pericardites	Drogas ilícitas
Indivíduos com marca-passo VVI	Corticosteroide
	Raiva
	Envenenamento
	Neoplasias (tratamento)

CIA = Comunicação interatrial

* Síndrome metabólica

1.1.5 Classificação

A FA é uma doença crônica evolutiva, sendo a sua atual classificação proposta pelas Diretrizes Brasileiras de Fibrilação Atrial⁶, editadas pela Sociedade Brasileira de Cardiologia, baseando-se no aspecto temporal e pode ser divididas em cinco tipos de FA abrangendo a sua progressão desde episódios não diagnosticados, passando pelo primeiro diagnóstico, e por episódios paroxísticos pouco frequentes, até a FA persistente de longa duração e, por fim, FA permanente.

- A FA inicial corresponde ao primeiro episódio diagnosticado de FA, independentemente da duração da arritmia ou da presença e gravidade dos sintomas relacionados com a FA.
- A FA paroxística é autolimitada, termina, em geral, dentro de 48 horas após seu início, podendo ou não apresentar recorrências. Embora a FA paroxística possa durar até 7 dias, as primeiras 48 horas são clinicamente relevantes, dado que, decorrido este período, a probabilidade de reversão espontânea é baixa.
- A FA persistente está presente quando há episódio que dura mais de 7 dias ou tem de ser terminado por cardioversão, quer farmacológica quer elétrica (CVE).
- A FA persistente de longa duração terá persistido durante um ano ou mais até se decidir adotar uma estratégia de controle do ritmo.
- A FA permanente é aquela em que as tentativas de reversão ao ritmo sinusal falharam ou quando o doente (e/ou o médico) aceita a presença da arritmia e faz a opção por não tentar a reversão da arritmia, por quaisquer meios.

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, 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 posteriormente, como o sistema nervoso autônomo (SNA) ou as células intersticiais tipo-Cajal (CITC).

Dada a relevância do tema e devido às recentes descobertas do papel da inervação autonômica e das CITC, é importante a realização de estudo para avaliar eventual papel do SNA simpático e das CITC na fibrilação atrial em corações humanos. Vale salientar que diversos artigos sobre a inervação autonômica cardíaca foram publicados, entretanto, o reduzido número de estudos em peças anatômicas humanas na literatura mundial enfatiza a importância desta pesquisa. Em relação às CITC que possuem poucas publicações na literatura da presença em corações humanos, necessitam-se de mais pesquisas para a sua consolidação.

Esse estudo analisou dois temas que poderiam estar relacionado à fibrilação atrial permanente, como cada tema possui sua individualidade, assim, dividimos a dissertação desta tese em de duas partes:

Parte I: o estudo imuno-histoquímico dos receptores adrenérgicos.

Parte II: o estudo imuno-histoquímico das células intersticiais tipo-Cajal

2 PARTE I – RECEPTORES ADRENÉRGICOS

2 PARTE I – RECEPTORES ADRENÉRGICOS

2.1 Introdução

2.1.1 O papel do sistema nervoso autônomo na FA

A fibrilação atrial é a arritmia complexa, com muitos mecanismos, entre os quais podemos citar as alterações na eletrofisiologia celular e no SNA. A FA necessita de um gatilho para a iniciação e de um substrato favorável para a manutenção. Após o início da FA, as propriedades elétricas e estruturais atriais são alteradas de uma forma que promovam a sua própria manutenção e/ou recorrências. É provável que nenhum mecanismo fisiopatológico único seja suficiente para criar substrato adequado, e sim a combinação de mecanismos é necessária para criar condições para a gênese e manutenção da FA.

O 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 adjacentes. É distribuído na gordura epicárdica atrial e ventricular, primariamente localizado na superfície atrial posterior e adjacente à origem da aorta e artéria pulmonar²⁴.

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 com o átrio esquerdo (AE) (PG atrial esquerdo superior), na junção da veia pulmonar superior direita com o AE se estendendo até o nó sinoatrial (PG atrial direito posterior) e na junção da veia cava inferior com o átrios (PG atrial esquerdo póstero-medial)²⁹. 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 obtuso²⁹ (Figuras 1 e 2).

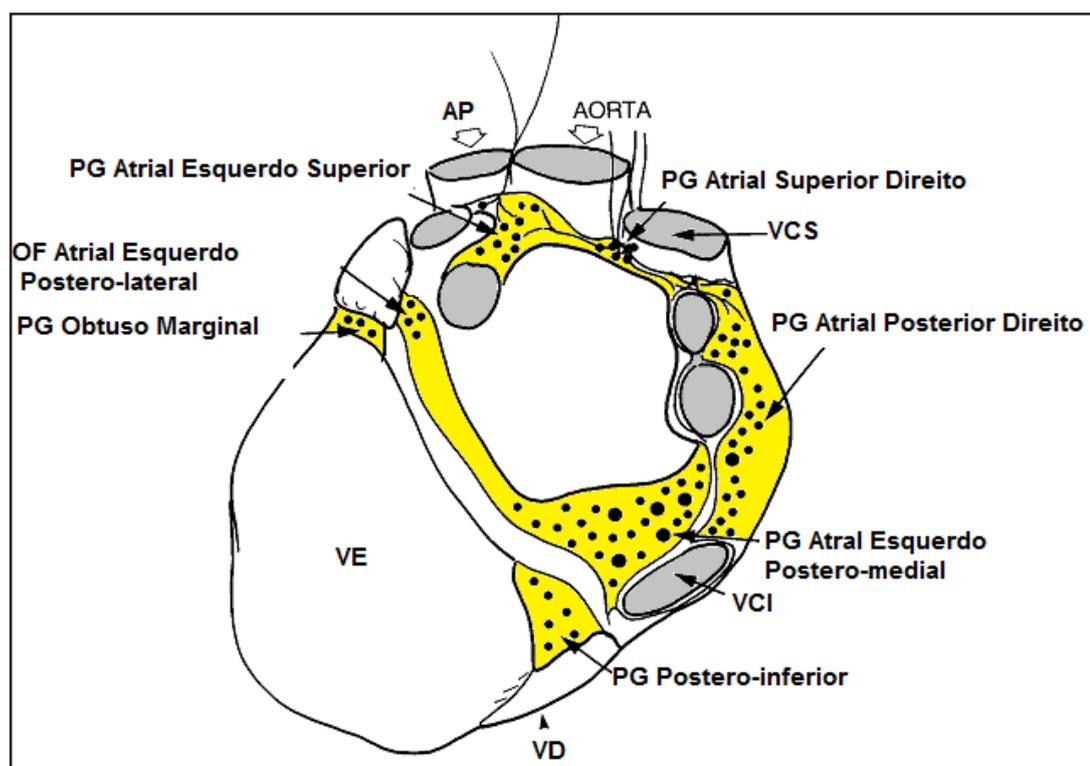


Figura 1 – Desenho do aspecto posterior de um coração humano e os plexos ganglionares (amarelo). VCI: veia cava inferior, VCS: veia cava superior, VE: ventrículo esquerdo, VD: ventrículo direito. Imagem cedida por Oliveira *et al.*²⁹ e adaptada de Armour *et al.*³⁰.

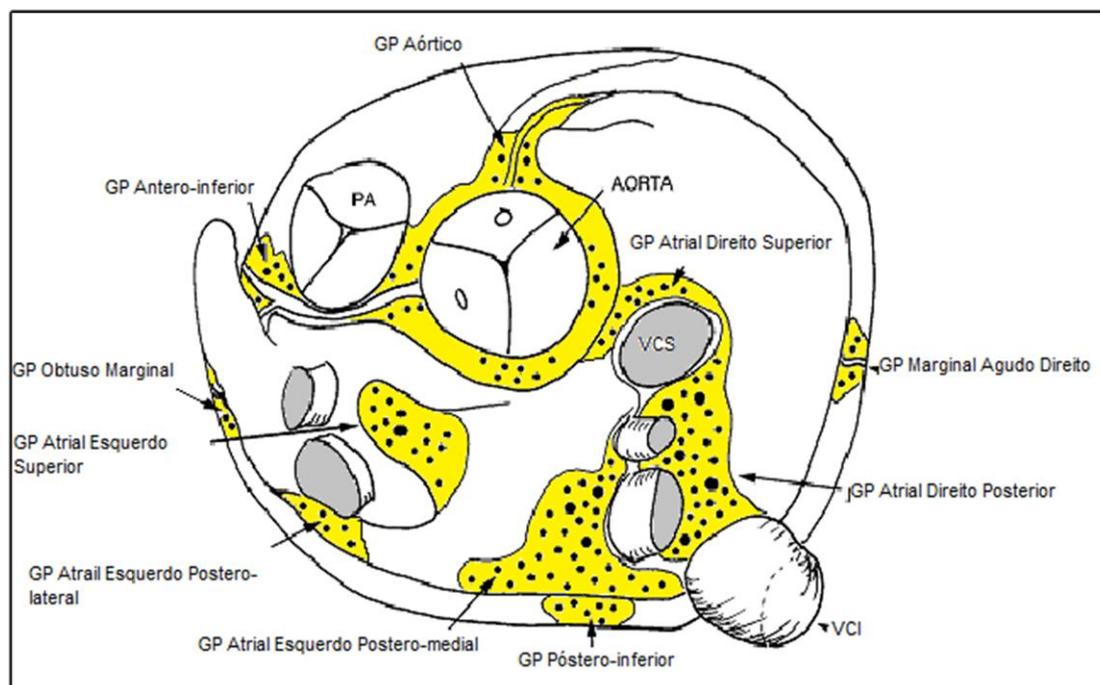


Figura 2 - Desenho do aspecto superior do coração humano e os plexos ganglionares (amarelo). VCI: veia cava inferior, VCS: veia cava superior, VE: ventrículo esquerdo, VD: ventrículo direito. Imagem cedida por Oliveira *et al.*²⁹ e adaptada de Armour *et al.*³⁰.

O SNA é didaticamente dividido em simpático e parassimpático, e suas alterações influenciam nas propriedades eletrofisiológicas atriais. Em indivíduos com doença cardíaca estrutural, a FA é frequentemente relacionada ao simpático, enquanto que, em pacientes sem doença cardíaca estrutural, parece ser mediada pelo vago³¹. A interação entre as estruturas nervosas e miócitos atriais provavelmente desempenha um papel na geração de atividades ectópicas, possivelmente devido a uma descarga paroxística do SNA, mas os mecanismos exatos pelos quais os focos arritmogênicos são acionados permanecem uma incógnita. Estudos anteriores demonstraram que o SNA cardíaco desempenha um papel crítico na dinâmica de iniciação e manutenção da FA^{32,33}. Alterações do tônus autonômico, envolvendo o sistema nervoso simpático e parassimpático, estão relacionadas ao início paroxístico da FA³⁴, devido à hiperatividade do SNA cardíaco intrínseco, o que provoca a liberação de uma quantidade excessiva de acetilcolina e catecolaminas, e pode levar a focos disparadores rápidos originados ou não nas VP³³. Tan *et al.*³⁵ relataram que nervos

simpático e parassimpático estão localizados dentro das veias pulmonares humanas. Eles descobriram que as descargas simpáticas e vagais simultâneas foram os gatilhos mais comuns de taquicardia atrial paroxística e fibrilação atrial, e demonstraram que a presença de descontinuidades da musculatura cardíaca na junção entre as VP e o AE poderia promover atividade de reentrada³⁵. Alterações do sistema nervoso autônomo, como aumento do tônus simpático ou perda do tônus vagal têm sido observadas antes de FA paroxística no pós-operatório³⁶, de flutter atrial³⁷ e FA paroxística que ocorre no sono³⁸, enquanto que uma mudança na direção contrária, ou seja, a predominância vagal, foi observada em pacientes jovens com FA isolada³⁹. A estimulação atrial rápida provoca remodelamento neural significativo caracterizado por aumento heterogêneo de inervação⁴⁰ simpático e crescimento extenso do nervo⁴¹. Estes resultados suportam a hipótese de que a atividade SNA é importante na geração de FA. Sharifov *et al.* relataram que a infusão do isoproterenol combinado à acetilcolina é mais eficaz do que a acetilcolina sozinha na indução de FA⁴². Estes resultados sugerem que a descarga simultânea simpátovagal modula as características eletrofisiológicas das células atriais (duração do potencial de ação, refratariedade e velocidade de condução), sendo particularmente pró-fibrilatória^{43,44}. Ng *et al.* sugerem que a remodelação autonômica pode também desempenhar um papel importante na criação de substrato de FA⁴⁵. Oliveira demonstrou que 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 FA permanente e que a expressão dos receptores muscarínicos está alterada, e pode estar relacionada com essa arritmia²⁹.

2.1.2 Receptores adrenérgicos

Os receptores β -adrenérgicos do miocárdio desempenham um papel importante na regulação da função cardíaca. Eles fazem parte da família dos

receptores acoplados à proteína G, que respondem a diferentes neurotransmissores. Eles mediam o sinal do transmissor dentro da célula. Em todas as células-alvo do sistema β -adrenérgico, integram um sistema proteico ternário: o receptor de superfície, a enzima adenilciclase e a proteína G. Os receptores β -adrenérgicos controlam a atividade da enzima adenilciclase (via proteína G), alterando a concentração intracelular de AMP cíclico. Na superfície celular, após ocorrer ocupação do sítio de acoplamento dos receptores β -adrenérgicos pelos neurotransmissores⁴⁶, um sinal intracelular é produzido, sob regulação das proteínas G. Estas proteínas (GMP-dependentes) são substâncias que realizam o acoplamento dos receptores de superfície à enzima adenilciclase. A proteína G pode exercer atividade estimulatória (Gs) ou inibitória (Gi) sobre a unidade catalítica da adenilciclase. O efetor do complexo é a própria enzima adenilciclase, que é capaz de converter o ATP em AMPc. Este tem a capacidade de ativar a proteína quinase e, com isso, promover a fosforilação de estruturas-alvo dentro da célula, regulando os fluxos de cálcio e sua ligação aos receptores intracelulares. Por fim, as propriedades elétricas e mecânicas no miocárdio se alteraram influenciando o cronotropismo, o inotropismo e o lusitropismo⁴⁷.

Ahlquist foi o primeiro a diferenciar os receptores adrenérgicos farmacologicamente em α e β . Posteriormente, foram distinguidos em subtipos α -1, α -2, β -1 e β -2 utilizando agonistas e antagonistas adrenérgicos⁽⁴⁸⁾. Atualmente, existem três subtipos diferentes de receptores β -adrenérgicos, que são os β -1, β -2 e β -3, e, nos últimos anos, tem-se mostrado farmacologicamente que um quarto β -adrenérgico pode existir. Em coração humano, o receptor adrenérgico predominante é o β -1 com uma relação β -1/ β -2 de 70-80%: 30-20% no ventrículo e no átrio humano, a proporção é de 60-70%: 40-30%^{49,50}. Ambos os receptores β -1 e β -2 são acoplados à proteína-Gs e a estimulação dos receptores provoca uma elevação do segundo mensageiro AMPc, promovendo o efeito inotrópico e cronotrópico positivo no miocárdio induzido por catecolaminas endógenas, tais como adrenalina e noradrenalina⁵¹.

2.2 Objetivo

Descrever e quantificar possíveis alterações na expressão miocárdica dos receptores adrenérgicos nos átrios de corações humanos, em particular, no esquerdo, e sua correlação com a fibrilação atrial permanente.

2.3 Casuística e Método

2.3.1 Definição e desenho do estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo, observacional, analítico e transversal, tipo caso-controle, realizado em corações humanos, por meio da análise de dois grupos com o estudo imuno-histoquímico dos receptores β -adrenérgicos, com intuito de descrever e analisar possíveis relações com a FAP.

Foram estudados ao total trinta e oito corações de cadáveres humanos, procedentes de necropsias 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), durante o período compreendido entre os anos de 2002 e 2011. A seleção dos casos foi realizada retrospectivamente obedecendo aos critérios de inclusão e exclusão que serão apresentados abaixo.

2.3.2 Critérios de inclusão

- 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 e descrição do laudo de necropsia;

- Corações com menos de cinco anos de preservação em formol a 10%.

2.3.3 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão utilizados:

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

Os corações foram divididos em dois grupos com o intuito de reduzir os vícios de seleção e aumentar o poder do estudo de detectar alterações exclusivamente envolvidas na FA. No Grupo I, foram selecionados dezenove corações de cadáveres humanos, acima de 18 anos, com história de fibrilação atrial permanente descrita e documentada em prontuário, sendo por meio de eletrocardiogramas prévios ou Holter de 24 horas e cardiopatia crônica. E, no Grupo II, dezenove corações cadáveres humanos, acima de 18 anos, sem fibrilação atrial descrita ou documentada em prontuário, ou seja, na história clínica, em eletrocardiogramas prévios ou ao Holter de 24 horas, e 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 eletrônicos (Sistema SI3), digitalizados e escritos dos pacientes, bem como, a descrição do laudo de necropsia 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 Grave⁵².

2.3.4 Dados dos pacientes

Na revisão dos prontuários dos pacientes, foram coletadas as variáveis demográficas, clínicas e ecocardiográficas que pudessem contribuir na fisiopatologia da fibrilação atrial, apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Comparações entre os grupos em relação às características demográficas e clínicas dos pacientes.

Variáveis	Grupo	
	I (com FAP) (n=19)	II (sem FAP) (n=19)
Sexo – n (%)		
Masculino	09 (47,4)	11 (57,9)
Feminino	10 (52,6)	08 (42,1)
Idade (anos) – média (dp)	72 (14,7)	66 (10,3)
Etiologia – n (%)		
Isquêmica	7 (36,8)	7 (36,8)
Dilatada Valvar	4 (21,1)	4 (21,1)
Hipertensiva	3 (15,8)	3 (15,8)
Dilatada Primária	2 (10,5)	2 (10,5)
Chagásica	3 (15,8)	3 (15,8)
Diabetes <i>Mellitus</i> – n (%)	5 (26,3)	5 (26,3)
Hipertensão Arterial Sistêmica – n (%)	12 (63,1)	12 (63,1)
Doença Arterial coronariana - n (%)	08 (42,1)	10 (52,6)
Infarto do Miocárdio* - n (%)	05 (26,3)	10 (52,6)
Insuficiência Cardíaca - n (%)	16 (84,2)	17 (89,5)
Diâmetro do AE*** (cm ³) - média (dp)	47,37 (6,55)	45,57 (7,32)
Fração de ejeção*** – média (dp)	37,89 (7,79)	35,73 (6,65)

dp=desvio padrão; *Infarto agudo ou prévio; ***medida pelo ecocardiograma.

Para a avaliação dos receptores β -adrenérgicos, existe uma questão adicional: se o uso de fármacos β -bloqueadores poderia interferir em sua expressão. Assim, foi, também, anotado se os pacientes estavam em uso de tal classe de medicamentos.

2.3.5 Amostragem dos corações

De cada coração, foram feitos quatro cortes, sendo dois cortes do átrio esquerdo: AE1- no trajeto médio da veia oblíqua do átrio esquerdo (VoAE); e AE2- na junção da veia pulmonar superior esquerda com o AE, e um no *fat-pad* atrial esquerdo superior (FP1) e um no átrio direito (na parede posterior – AD1). A escolha se deu porque há evidências científicas de que tais regiões do átrio esquerdo são relevantes na FA. Já 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.

2.3.6 Processamento histológico

Após processamento histológico habitual com embebição em parafina, cortes sucessivos de 4 micrômetros de espessura das amostras teciduais foram submetidos a reações de imuno-histoquímica, conforme será descrito adiante, para análise dos receptores adrenérgicos presentes no miocárdio.

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

2.3.7 Técnica de imuno-histoquímica

Das amostras teciduais previamente parafinadas em blocos, foram realizados os cortes de 4µm de espessura e colocados em lâminas silanizadas (*Sigma Chemical Co.*; St. Louis, Missouri, EUA) em suporte adequado. O processo de desparanifinação foi feito ao colocar as lâminas em xilol quente, em estufa a 60 – 65° C, durante 10 minutos e passadas rapidamente em 3 banhos de xilol frio. Para hidratação dos cortes, as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95° e um banho de álcool 70°. Em seguida, foram lavadas em água corrente, água deionizada e deixadas em tampão fosfato pH 7,4. O próximo passo foi a recuperação dos sítios antigênicos realizada em panela de pressão (Pascal, Dakocytomation, Model: 2800, USA) a 125°C por 1 minuto e pressão de, aproximadamente, 25mmHg em alta temperatura. O tampão de recuperação utilizado foi uma solução de ácido cítrico 10 mM PH 6,0. O bloqueio da peroxidase endógena presente nas hemácias foi feito com água oxigenada 10 volumes (3%). O bloqueio das proteínas inespecíficas foi feito com imersão das lâminas em caseína diluída em tampão fosfato pH 7,4 (*Synth*, São Paulo, Brasil) por 5 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em 1% de albumina de soro bovino (BSA) por 24 horas a 4°C e, posteriormente, incubados com o anticorpo secundário SuperPicture Polímero HRP Conjugado (*Invitrogen*, Carlsbad, CA) e utilizado como cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (*Sigma-Aldrich Chemie*, Steinheim, Alemanha). Posteriormente, ocorreu a contracoloração com Hematoxilina de Harris (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) para todos os casos.

Foram utilizados os seguintes anticorpos com as respectivas diluições: receptor β-adrenérgico tipo 1 1:200 (Anticorpo β1-AR, V-19, RABBIT IgG - 200µg/mL - SC568, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, Califórnia, EUA); receptor β-adrenérgico tipo 2 1:50 (Anticorpo β2-AR, M-20, RABBIT IgG - 200µg/mL - SC570, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, Califórnia, EUA); receptor β-adrenérgico tipo 3 1:20 (Anticorpo β3-AR, M-20,

GOAT IgG-.200µg/mL - SC1473, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, Califórnia, EUA.) e receptor GRK5 1:200 (Anticorpo GRK5, C-20, RABBIT IgG - 200µg/mL - SC565, Santa Cruz Biotechnology Inc , Santa Cruz, Califórnia, EUA).

As diluições dos anticorpos para os receptores adrenérgicos foram determinadas após testes preliminares, correspondendo a diluições supra-ótimas dos anticorpos, em comparação com tecidos-controle. Foram utilizadas diluições supra-ótimas para aumentar o contraste entre áreas positivas e negativas^{29,53}.

2.3.8 Quantificação dos receptores adrenérgicos

Nesta fase, as lâminas foram estudadas sem que o observador tivesse conhecimento de a qual grupo os casos em análise pertenciam. Foi utilizada histomorfometria computadorizada por meio do sistema de análise de imagens *Axiovision 4.6* (Carl Zeiss, Alemanha), acoplado a microscópio *Axio imager A1* da mesma marca, utilizando objetiva 40x.

A determinação da concentração de cada um dos receptores adrenérgicos foi feita por meio de detecção automática pelo equipamento das áreas fortemente positivas para o cromógeno sobre área miocárdica total, em micrômetros quadrados (Figura 3).

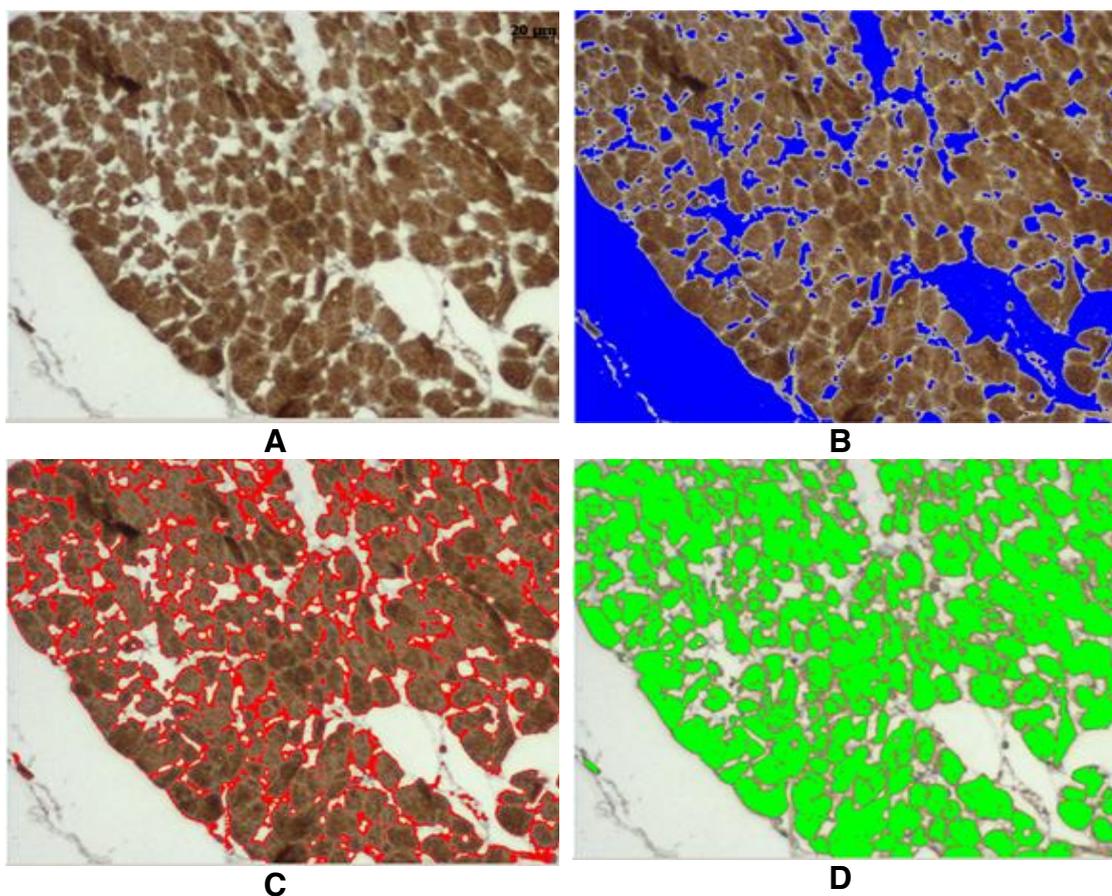


Figura 3 - Foto sequencial da tela do sistema utilizado na detecção automática de cores do sistema de análise de imagens Axiovision 4.6 (Carl Zeiss, Alemanha), acoplado a microscópio Axio imager A1 da mesma marca. A: Foto em aumento de 40x de receptor adrenérgico subtipo 1. B: Detecção do interstício. C: Detecção do tecido miocárdico negativo. D: Detecção de tecido miocárdico positivo para o receptor adrenérgico subtipo 1.

Foram adquiridos três campos de cada corte, obedecendo à regra de uma foto por campo visual, partindo da parte do tecido próxima à etiqueta da lâmina. Na eventual ocorrência de artefatos, um novo campo seria analisado seguindo a mesma regra (Figura 4).

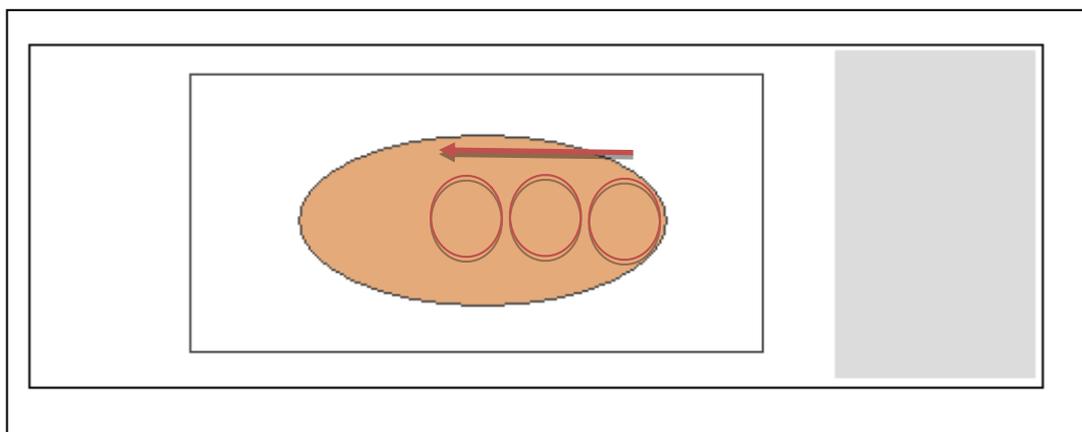


Figura 4 - Desenho esquemático do método utilizado na leitura das lâminas para os receptores adrenérgicos. Adaptada de Oliveira *et al.*²⁹

Os casos foram comparados pelos dados percentuais obtidos de área miocárdica positiva entre os casos do grupo I e II.

2.3.9 Análise estatística

As características dos pacientes foram comparadas utilizando o teste *t* de Student ou Mann-Whitney. As comparações foram feitas em cada região analisada, considerando, conjuntamente, os cortes do átrio esquerdo, e todos os cortes. Foi feita comparação não só entre os dois grupos principais, mas também entre pacientes dos dois grupos que tomavam medicamentos β -bloqueadores e também comparamos os pacientes que tomavam o β -bloqueador com os que não tomavam independente de terem ou não FA.

Os dados com distribuição normal foram apresentados em valor médio e desvio padrão (dp).

O nível de significância adotado neste estudo foi 0,05 e o programa estatístico para efetuar os cálculos foi o *SigmaStat for Windows*, versão 3.5.

2.3.10 Aspectos éticos

O estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo A), da referida instituição, sob Parecer de número 890/07 e obedeceu aos critérios éticos impostos pela Resolução N° 196, de 10 de outubro de 1996, revogada em dezembro/2012, passando a vigorar a Resolução N° 466/12, que regulamenta as pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil.

2.3.11 Financiamento

Esta pesquisa foi financiada, em sua maior parte, pela Funcap – Fundação Cearense de Apoio e Desenvolvimento Científico e Tecnológico, sob título de projeto “Doutorado Interinstitucional em Cardiologia USP/UECE/UFC”, sob Processo n° MD1-0053-00037.01.00/12.

Também foi recebida verba pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, sob o título de projeto “Identificação e caracterização da inervação autonômica atrial e suas implicações na fibrilação atrial”, sob Processo n° 2007/56648-8.

2.4 Resultados

As amostras de todos os corações tiveram os subtipos dos receptores adrenérgicos β_1 , β_2 , β_3 e GRK5 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.

Não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de positividade dos receptores adrenérgicos subtipo β_1 , tanto quando avaliamos cada corte individualmente, como o átrio esquerdo isoladamente

(AE1 + AE2) ou todos os cortes juntos. Tais resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo β_1

	% de miocárdio positivo		
	I (c/FA)	II (s/FA)	p - valor
Átrio direito - parede posterior - AD1	31,6 (19,7)	33,0 (20,4)	0,835
Átrio esquerdo - trajeto médio da VoAe - AE1	36,7 (21,5)	35,1 (22,6)	0,826
Átrio esquerdo - junção da veia pulmonar superior esquerda - AE2	29,1 (17,8)	38,8 (25,3)	0,178
Átrio esquerdo - cortes AE1 e AE2	34,2 (22,7)	32,4 (20,2)	0,710
FP atrial esquerdo superior - FP1	34,4 (22,8)	24,9 (20,0)	0,181
Todos os cortes	33,4 (21,7)	33,3 (21,0)	0,984

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. VoAe-veia oblíqua do átrio esquerdo.

Adicionalmente, analisamos a expressão dos receptores β_1 com relação ao uso ou não de β -bloqueador nos dois grupos e com relação ao uso ou não de β -bloqueador independente da presença de fibrilação atrial, resultando, também, na ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Tais resultados são apresentados nas Tabelas 3-5.

Tabela 3 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo 1 (β_1) em pacientes em uso de β -bloqueador

	% de miocárdio positivo		
	I (c/FA)	II (s/FA)	p - valor
Átrio direito - parede posterior - AD1	31.8 (25.4)	37.5 (23.1)	0.604
Átrio esquerdo - trajeto médio da VoAe - AE1	29.2 (21.1)	19.1 (15.1)	0.255
Átrio esquerdo - junção da veia pulmonar superior esquerda - AE2	30.2 (19.8)	33.6 (19.0)	0.703
Átrio esquerdo - cortes AE1 e AE2	29.8 (19.9)	26.4 (18.3)	0.584
FP atrial esquerdo superior - FP1	28.8 (21.4)	32.8 (23.0)	0.690
Todos os cortes	30.0 (21.2)	30.8 (20.8)	0.875

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.

Tabela 4 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo 1 (β_1) em pacientes sem β -bloqueador

	% de miocárdio positivo		
	I (c/FA)	II (s/FA)	p - valor
Átrio direito - parede posterior - AD1	34.6 (23.8)	34.4 (15.6)	0.971
Átrio esquerdo - trajeto médio da VoAe - AE1	23.9 (18.4)	35.7 (21.9)	0.114
Átrio esquerdo - junção da veia pulmonar superior esquerda - AE2	31.9 (19.0)	35.4 (23.4)	0.645
Átrio esquerdo - cortes AE1 e AE2	28.0 (18.9)	35.6 (22.2)	0.150
FP atrial esquerdo superior - FP1	30.8 (21.8)	27.8 (18.8)	0.677
Todos os cortes	30.4 (20.9)	33.4 (19.9)	0.405

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

Tabela 5 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo 1 (β_1) em relação ao uso de β -bloqueador

	% de miocárdio positivo		
	c/ β -bloq.	s/ β -bloq.	p - valor
Átrio direito - parede posterior - AD1	35,7 (3,13)	43,8 (8,2)	0.162
Átrio esquerdo - trajeto médio da VoAe - AE1	56,3 (21,9)	35,4 (27,9)	0.315
Átrio esquerdo - junção da veia pulmonar superior esquerda - AE2	44,2 (28,8)	37,2 (20,5)	0.699
Átrio esquerdo - cortes AE1 e AE2	50,2 (23,8)	36,3 (23,1)	0.267
FP atrial esquerdo superior - FP1	51,0 (19,5)	33,0 (33,3)	0.434
Todos os cortes	46,8 (19,3)	37,3 (22,7)	0.239

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 resultados referentes aos receptores adrenérgicos subtipo β_2 demonstram não haver alterações estatisticamente significantes na expressão da sua porcentagem de positividade, tanto quando avaliamos cada corte individualmente, o átrio esquerdo isoladamente (AE1 + AE2) e todos os cortes juntos. Tais resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo β_2

	% de miocárdio positivo		
	I (c/FA)	II (s/FA)	p - valor
Átrio direito - parede posterior - AD1	31,6 (19,7)	33,0 (20,4)	0,835
Átrio esquerdo - trajeto médio da VoAe - AE1	36,7 (21,5)	35,1 (22,6)	0,826
Átrio esquerdo - junção da veia pulmonar superior esquerda - AE2	29,1 (17,8)	38,8 (25,3)	0,178
Átrio esquerdo - cortes AE1 e AE2	32,8 (19,4)	36,9 (23,7)	0,410
FP atrial esquerdo superior - FP1	34,3 (12,5)	16,2 (8,8)	0,218
Todos os cortes	28,6 (20,1)	31,8 (22,1)	0,857

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.

Adicionalmente, analisamos a expressão dos receptores β_2 com relação ao uso ou não de β -bloqueador nos dois grupos e com relação ao uso ou não de β -bloqueador independente da presença de fibrilação atrial, resultando também na ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (Tabelas 7 a 9).

Tabela 7 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo 2 (β_2) em pacientes em uso de β -bloqueador

	% de miocárdio positivo		
	I (c/FA)	II (s/FA)	p - valor
Átrio direito - parede posterior - AD1	31.8 (25.5)	37.5 (23.1)	0.604
Átrio esquerdo - trajeto médio da VoAe - AE1	29.2 (21.1)	19.2 (15.1)	0.244
Átrio esquerdo - junção da veia pulmonar superior esquerda - AE2	30.3 (19.9)	33.7 (19.0)	0.703
Átrio esquerdo - cortes AE1 e AE2	29.8 (19.9)	26.4 (18.3)	0.584
FP atrial esquerdo superior - FP1	28.8 (21.4)	32.8 (23.1)	0.690
Todos os cortes	30.0 (21.2)	30.8 (20.8)	0.875

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.

Tabela 8 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo 2 (β_2) em pacientes sem β -bloqueador

	% de miocárdio positivo		
	I (c/FA)	II (s/FA)	p - valor
Átrio direito - parede posterior - AD1	32.5 (13.5)	37.0 (19.1)	0.619
Átrio esquerdo - trajeto médio da VoAe - AE1	42.0 (26.6)	27.0 (10.1)	0.217
Átrio esquerdo - junção da veia pulmonar superior esquerda - AE2	31.7 (27.6)	40.6 (17.7)	0.504
Átrio esquerdo - cortes AE1 e AE2	36.8 (26.7)	33.7 (15.4)	0.707
FP atrial esquerdo superior - FP1	31.7 (20.2)	22.7 (17.1)	0.397
Todos os cortes	32.8 (21.7)	32.1 (18.8)	0.898

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.

Tabela 9 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo 2 (β_2) em relação ao uso de β -bloqueador

	% de miocárdio positivo		
	c/ β -bloq.	s/ β -bloq	p - valor
Átrio direito - parede posterior - AD1	34.6 (23.8)	34.4 (15.6)	0.971
Átrio esquerdo - trajeto médio da VoAe - AE1	23.9 (18.4)	35.5 (21.9)	0.119
Átrio esquerdo - junção da veia pulmonar superior esquerda - AE2	31.9 (19.0)	35.4 (23.4)	0.645
Átrio esquerdo - cortes AE1 e AE2	28.0 (18.9)	35.5 (22.2)	0.154
FP atrial esquerdo superior - FP1	30.8 (21.8)	27.8 (18.8)	676.000
Todos os cortes	30.4 (20.8)	33.3 (19.9)	0.411

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

Os resultados referentes aos receptores adrenérgicos subtipo β_3 demonstraram não haver alterações estatisticamente significantes na expressão da sua porcentagem de positividade, tanto quando avaliamos cada corte individualmente, como o átrio esquerdo isoladamente (AE1 + AE2) e todos os cortes juntos. Tais resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo β_3

	% de miocárdio positivo		
	I (c/FA)	II (s/FA)	p - valor
Átrio direito - parede posterior - AD1	44,0 (21,9)	40,2 (18,1)	0,574
Átrio esquerdo - trajeto médio da VoAe - AE1	40,4 (20,8)	34,0 (20,7)	0,362
Átrio esquerdo - junção da veia pulmonar superior esquerda - AE2	43,4 (15,1)	45,5 (19,5)	0,708
FP atrial esquerdo superior - FP1	44,3 (19,7)	36,1 (22,2)	0,237
Átrio esquerdo - cortes AE1 e AE2	42,0 (17,8)	39,8 (20,7)	0,624
Todos os cortes	43,1 (19,1)	39,0 (20,3)	0,206

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.

Adicionalmente, analisamos a expressão dos receptores β_3 com relação ao uso ou não de β -bloqueador nos dois grupos e com relação ao uso ou não de β -bloqueador independente da presença de fibrilação atrial, resultando também na ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (Tabelas 11 a 13).

Tabela 11 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo 3 (β_3) em pacientes em uso de β -bloqueador

	% de miocárdio positivo		
	I (c/FA)	II (s/FA)	p - valor
Átrio direito - parede posterior - AD1	45,4 (27,1)	43,1 (16,0)	0,821
Átrio esquerdo - trajeto médio da VoAe - AE1	41,4 (24,4)	33,5 (19,9)	0,448
Átrio esquerdo - junção da veia pulmonar superior esquerda - AE2	44,2 (15,1)	43,5 (18,9)	0,927
FP atrial esquerdo superior - FP1	42,7 (20,5)	39,2 (28,1)	0,721
Átrio esquerdo - cortes AE1 e AE2	42,9 (19,5)	38,5 (19,6)	0,489
Todos os cortes	43,5 (21,4)	39,8 (18,9)	0,426

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.

Tabela 12 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo 3 (β_3) em pacientes sem β -bloqueador

	% de miocárdio positivo		
	I (c/FA)	II (s/FA)	p - valor
Átrio direito - parede posterior - AD1	42,2 (14,4)	36,9 (20,6)	0,597
Átrio esquerdo - trajeto médio da VoAe - AE1	39,3 (17,6)	34,5 (22,8)	0,642
Átrio esquerdo - junção da veia pulmonar superior esquerda - AE2	42,4 (15,8)	47,7 (21,0)	0,331
FP atrial esquerdo superior - FP1	46,1 (19,8)	32,7 (23,5)	0,207
Átrio esquerdo - cortes AE1 e AE2	40,9 (16,2)	41,1 (22,3)	0,804
Todos os cortes	42,6 (16,5)	37,9 (21,8)	0,470

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.

Tabela 13 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos subtipo 3 (β_3) em relação ao uso de β -bloqueador

	% de miocárdio positivo		
	c/ β -bloq.	s/ β -bloq.	p - valor
Átrio direito - parede posterior - AD1	44,3 (21,7)	39,4 (17,7)	0,464
Átrio esquerdo - trajeto médio da VoAe - AE1	37,3 (21,9)	36,8 (20,1)	0,944
Átrio esquerdo - junção da veia pulmonar superior esquerda - AE2	43,8 (16,7)	45,1 (18,3)	0,819
FP atrial esquerdo superior - FP1	40,9 (20,7)	39,4 (22,2)	0,824
Átrio esquerdo - cortes AE1 e AE2	40,6 (19,4)	41,1 (19,4)	0,922
Todos os cortes	41,6 (20,1)	40,2 (19,4)	0,860

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 resultados referentes aos receptores adrenérgicos GRK5 demonstraram não haver alterações estatisticamente significantes na expressão da sua porcentagem de positividade, tanto quando avaliamos cada corte individualmente como o átrio esquerdo isoladamente (AE1 + AE2) e todos os cortes juntos. Tais resultados são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos GRK5

	% de miocárdio positivo		
	I (c/FA)	II (s/FA)	p - valor
Átrio direito - parede posterior - AD1	46,0 (21,7)	47,5 (12,2)	0,798
Átrio esquerdo - trajeto médio da VoAe - AE1	43,6 (21,7)	46,1 (19,6)	0,717
Átrio esquerdo - junção da veia pulmonar superior esquerda - AE2	48,2 (15,8)	52,1 (13,5)	0,426
FP atrial esquerdo superior - FP1	48,7 (19,2)	43,3 (17,9)	0,378
Átrio esquerdo - cortes AE1 e AE2	46,1 (18,7)	49,1 (16,9)	0,463
Todos os cortes	46,7 (19,3)	47,3 (16,1)	0,858

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.

Adicionalmente, analisamos a expressão dos receptores GRK5 com relação ao uso ou não de β -bloqueador nos dois grupos e com relação ao uso ou não de β -bloqueador independente da presença de fibrilação atrial, resultando também na ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (Tabelas 15 a 17).

Tabela 15 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos GRK5 em pacientes em uso de β -bloqueador

	% de miocárdio positivo		
	I (c/FA)	II (s/FA)	p - valor
Átrio direito - parede posterior - AD1	47,0 (27,9)	50,1 (8,1)	0,850
Átrio esquerdo - trajeto médio da VoAe - AE1	38,7 (21,8)	42,6 (22,8)	0,709
Átrio esquerdo - junção da veia pulmonar superior esquerda - AE2	47,3 (16,1)	47,8 (15,1)	0,946
FP atrial esquerdo superior - FP1	42,6 (20,5)	45,5 (18,3)	0,737
Átrio esquerdo - cortes AE1 e AE2	43,2 (19,0)	45,2 (19,0)	0,749
Todos os cortes	44,0 (21,4)	46,5 (16,5)	0,566

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.

Tabela 16 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos GRK5 em pacientes sem β -bloqueador

	% de miocárdio positivo		
	I (c/FA)	II (s/FA)	p - valor
Átrio direito - parede posterior - AD1	44,7 (11,8)	44,5 (15,5)	0,981
Átrio esquerdo - trajeto médio da VoAe - AE1	49,1 (21,5)	50,0 (15,8)	0,921
Átrio esquerdo - junção da veia pulmonar superior esquerda - AE2	49,3 (16,3)	56,9 (10,3)	0,256
FP atrial esquerdo superior - FP1	55,5 (16,2)	40,9 (18,2)	0,09
Átrio esquerdo - cortes AE1 e AE2	49,2 (18,3)	53,5 (13,4)	0,439
Todos os cortes	49,8 (16,5)	48,1 (15,8)	0,653

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.

Tabela 17 - Comparações entre os grupos em relação à expressão dos receptores adrenérgicos GRK5 em relação ao uso de β -bloqueador

	% de miocárdio positivo		
	c/ β -bloq.	s/ β -bloq.	p - valor
Átrio direito - parede posterior - AD1	48,6 (20,1)	44,6 (13,5)	0,490
Átrio esquerdo - trajeto médio da VoAe - AE1	40,8 (21,8)	49,6 (18,1)	0,198
Átrio esquerdo - junção da veia pulmonar superior esquerda - AE2	47,5 (15,2)	53,1 (13,8)	0,245
FP atrial esquerdo superior - FP1	44,1 (18,9)	48,2 (18,3)	0,497
Átrio esquerdo - cortes AE1 e AE2	44,2 (18,8)	51,4 (15,9)	0,082
Todos os cortes	45,3 (19,0)	48,9 (16,0)	0,212

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.

2.5 Discussão

2.5.1 Considerações sobre a seleção da amostra

Conforme descrito por Oliveira²⁹, a prevalência de FA permanente nos casos de autópsia realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica do InCor/HCFMUSP foi de 9%. Foram selecionadas lâminas de 18 casos e 18 controles, sendo que foram utilizadas lâminas de 13 casos e 12 controles do

estudo realizado por Oliveira na defesa de sua tese de doutorado, nos cortes descritos no material e método deste estudo²⁹. Os cortes anatômicos de quatro áreas diferente do coração não foram aleatórios. No átrio esquerdo, foram analisadas a porção média do trajeto da VoAe (AE1), definida em vários trabalhos como ligamento repleto de inervação cardíaca intrínseca⁵⁹. A junção da veia pulmonar superior esquerda com o átrio esquerdo (AE2) foi escolhida devido a evidências que demonstraram descontinuidades e desconexões miocárdicas com possível potencial reentrante³⁵; além disso, as veias pulmonares são a principal fonte de focos ectópicos deflagradores da fibrilação atrial¹⁹. O PG atrial esquerdo superior (FP1), intimamente relacionado com as veias pulmonares superiores, foi escolhido por dados que sugerem um importante papel da inervação autonômica na fisiopatologia da fibrilação atrial paroxística e porque as áreas circunvizinhas das veias pulmonares são importantes vias de inervação pós-ganglionares para o átrio esquerdo. Já a parede posterior do átrio direito (AD1) foi escolhida para servir de controle para o controle das observações realizadas, visto que não há descrição dessa região como potencial geradora de *triggers* ou de reentrada.

2.5.2 Expressão dos diversos subtipos dos receptores adrenérgicos no miocárdio atrial humano e relação com fibrilação atrial permanente

Os resultados da análise da expressão dos receptores adrenérgicos demonstraram, em diversos locais do miocárdio atrial, uma distribuição heterogênea entre os diversos subtipos de receptores. A técnica utilizada, além de mostrar as alterações na expressão dos receptores, permite observar sua distribuição tecidual e sua localização intracelular. Apesar de que a expressão dos receptores talvez não represente sua função, eventuais alterações em sua concentração poderiam corresponder a alterações em sua atividade²⁹.

As diluições utilizadas para cada receptor foram supra-ótimas, permitindo, desta forma, a identificação consistente da positividade para os anticorpos⁵³, como explicado em material e métodos.

Um estudo anterior realizado por Oliveira²⁹ demonstrou, dentre outras questões, que a expressão dos receptores muscarínicos em coração humanos está alterada e que pode estar relacionada com a FA persistente.

Esse estudo analisou a expressão dos receptores adrenérgicos β 1, que não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos independente do uso ou não β -bloqueadores. Como essa classe de medicamento poderia influenciar a expressão desses receptores, fizemos a análise dos dois grupos separando quem estava e quem não estava usando tal classe de medicamentos. Primeiramente, analisamos quem estava utilizando os β -bloqueadores e não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. A mesma análise foi realizada para quem não estava usando os β -bloqueadores e o resultado foi semelhante ao anterior. Com o objetivo de esgotar a questão do uso de tal classe de medicamentos, fizemos a comparação entre os grupos que estavam usando os β -bloqueadores e os que não estavam tomando independente de ter ou não FA, e também o resultado ausência de diferença estatisticamente significativa. A mesma análise foi feita para os outros subtipos de receptores β 2, β 3 e o GRK5, e, não diferentemente do que ocorreu com o subtipo β 1, não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados.

3 PARTE II – CÉLULAS INTERSTICIAIS TIPO-CAJAL

3 PARTE II – CÉLULAS INTERSTICIAIS TIPO-CAJAL

3.1 Introdução

3.1.1 Células intersticiais do tipo-Cajal

As CIC foram descritas em 1911 por Santiago Ramón y Cajal, localizadas no revestimento muscular do intestino e, inicialmente, chamadas de neurônios intersticiais, uma vez que se pareciam com células nervosas e eram identificadas por meio de técnicas histoquímicas utilizando azul de metileno e coloração pela prata, semelhantes às utilizadas para marcar os neurônios. Cerca de meio século depois, Faussone-Pellegrini MS *et al.* e, posteriormente, Thunneberg L, sob o uso da microscopia eletrônica, evidenciaram que essas células não eram neurônios e as rotularam como células intersticiais de Cajal (CIC)⁶⁰. Atualmente, existem vários dados disponíveis na literatura demonstrando o mapa completo de distribuição das CIC no intestino, com descrição detalhada das características ultraestruturais, assim como a expressão dessas células por meio de marcadores como c-kit (CD-117) e o seu envolvimento na regulação de sua função como atividade motora peristáltica do trato gastrointestinal, não apenas como célula de marca-passo, mas, também, como neurotransmissor⁶¹⁻⁶³. Estas células mostram-se sobrepostas a diversas outras células, incluindo neurônios entéricos, células do sistema imune e células do músculo liso⁶³.

As células intersticiais de Cajal são responsáveis pela motilidade intestinal⁶⁴, apresentam características imunofenotípicas e ultraestruturais tanto de músculo liso quanto de diferenciação neural e expressam o receptor Kit (CD117) semelhante ao tumor estromal gastrointestinal. O Kit é um receptor tirosina quinase transmembrana, responsável por várias funções

celulares, dentre as quais proliferação, adesão, apoptose e diferenciação celular.

As células intersticiais de Cajal geram e propagam “ondas lentas”, espontaneamente, para as camadas musculares, possuindo, desta forma, atividade automática com presença de potenciais em platô e responsividade de acordo com a resposta do sistema nervoso autônomo, sendo descritas como o marca-passo responsável pela motilidade espontânea do intestino⁶⁵. Sua distribuição desenha uma rede em todo o intestino. Estas células foram também encontradas em diversos outros órgãos, tais como vasos, pâncreas, bexiga, glândula mamária e coração, com papéis ainda sob investigação⁶⁶.

Em 2005, Hiniesco e Popescu descreveram células intersticiais tipo-Cajal (CITC) em amostras atriais humanas, em microscopia eletrônica; anteriormente, pensava-se que células eram fibroblastos⁶⁷. Foi descrito que a percentagem da área ocupada pelas CITC é de, aproximadamente, 1,5% do total do volume do miocárdio atrial⁶⁶.

Mais recentemente, os mesmos autores caracterizaram as CITC de forma ultraestrutural e imuno-histoquímica, demonstrando a positividade das células para anticorpos policlonais CD117 (c-kit) e CD 34⁶⁶. Eles também sugerem alguns papéis para as CITC, como disparadores em arritmias, intermediando sinais entre nervos intrínsecos e os miócitos, e organizadores celulares durante a embriogênese.

A FA é a arritmia sustentada mais comum da prática clínica, mas sua fisiopatologia não é totalmente compreendida. As veias pulmonares são consideradas como o principal local de iniciação da fibrilação, mas a identificação precisa do substrato responsável atividade focal dentro da camada muscular é desconhecido. As CITC podem ser detectadas em veias pulmonares, particularmente em pacientes portadores de FA. Tendo em vista as propriedades eletrofisiológicas dessas células, seu papel na FA está precisando ser mais estudado⁶⁸.

3.2 Objetivo

Descrever e quantificar as células intersticiais tipo-Cajal nos átrios de corações humanos, em particular, no esquerdo, e suas possíveis correlações com a fibrilação atrial permanente.

3.3 Casuística e método

3.3.1 Definição e desenho do estudo

Trata-se de um estudo prospectivo, observacional, analítico e transversal, tipo caso-controle, realizado em corações humanos, por meio da análise de dois grupos com o estudo imuno-histoquímico das células intersticiais tipo-Cajal com intuito de descrever e analisar possíveis relações na FAP.

Foram estudados doze corações de cadáveres humanos, procedentes de necropsias 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 prospectivamente obedecendo aos critérios de inclusão e exclusão que serão apresentados abaixo.

3.3.2 Critérios de inclusão

- Corações de cadáveres humanos, acima de 18 anos, sem história de fibrilação atrial ou qualquer taquiarritmia supraventricular descrita, obtidos em necropsias 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 necropsia.

- Cardiopatias pareadas com o Grupo I.
- Peças com preservação em formol tamponado a 10% por 24 a 72 horas.

3.3.3 Critérios de exclusão

- Pacientes previamente 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.

Os corações foram divididos em dois grupos, o grupo I com seis corações humanos com FA e o grupo II com seis corações humanos sem FA ou história de qualquer taquiarritmia supraventricular, sendo selecionados utilizando os mesmos critérios usados para seleção dos receptores adrenérgicos. O pareamento foi realizado baseado na cardiopatia.

3.3.4 Dados dos pacientes

Na revisão dos prontuários dos pacientes, foram coletadas as variáveis demográficas e clínicas que pudessem contribuir na fisiopatologia da fibrilação atrial, sendo demonstradas comparativamente na Tabela 18.

Tabela 18 - Comparações entre os grupos em relação às características demográficas e clínicas dos pacientes

Variáveis	Grupo	
	I (com FAP) (n=06)	II (sem FAP) (n=06)
Sexo – n (%)		
Masculino	02 (33,3)	02 (33,3)
Feminino	04 (66,6)	04 (66,6)
Idade (anos) – média (dp)	69,1 (15,0)	54,0 (16,6)
Etiologia – n (%)		
Isquêmica	0	0
Dilatada Valvar	02 (33,3)	02 (33,3)
Dilatada Primária	02 (33,3)	02 (33,3)
Chagásica	02 (33,3)	02 (33,3)
Diabetes <i>Mellitus</i> – n (%)	04 (66,6)	5 (83,3)
Hipertensão Arterial Sistêmica – n (%)	03 (50)	03 (50)
Doença Arterial coronariana - n (%)	0	1 (16,7)
Infarto do Miocárdio* - n (%)	0	0
Insuficiência Cardíaca - n (%)	05 (83,3)	06 (100)

dp=desvio padrão; * Infarto agudo ou prévio.

3.3.5 Amostragem dos corações

De cada coração, foi realizado um corte no átrio esquerdo (AE1- no trajeto médio da veia oblíqua do átrio esquerdo (VoAE)). A escolha se deu porque há evidências científicas de que tal região do átrio esquerdo é relevante na FA e também porque os dados existentes na literatura são relacionados à presença das CITC, principalmente nas veias pulmonares.

3.3.6 Processamento histológico

Após processamento histológico habitual com embebição em parafina, cortes sucessivos de 4 micrômetros de espessura das amostras teciduais foram submetidos a reações de imuno-histoquímica, conforme será descrito adiante, para análise das células tipo-Cajal presentes no miocárdio.

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

3.3.7 Técnica de imuno-histoquímica

Das amostras teciduais previamente parafinadas em blocos, foram realizados os cortes de 4 μ m de espessura e colocados em lâminas silanizadas (*Sigma Chemical Co.*; St. Louis, Missouri, EUA) em suporte adequado. O processo de desparanifinização foi feito ao colocar as lâminas em xilol quente, em estufa a 60 – 65° C, durante 10 minutos, e passadas, rapidamente, em 3 banhos de xilol frio. Para hidratação dos cortes, as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95° e um banho de álcool 70°. Em seguida, foram lavadas em água corrente, água deionizada e deixadas em tampão fosfato pH 7,4. O próximo passo foi a recuperação dos sítios antigênicos realizada em panela de pressão (Pascal, Dakocytomation, Model: 2800, USA) a 125°C por 1 minuto e pressão de, aproximadamente, 25mmHg em alta temperatura. O tampão de recuperação utilizado foi uma solução de ácido cítrico 10 mM PH 6.0 a triptase e, para o CD117, foi o Tris EDTA pH 9,0. O bloqueio da peroxidase endógena presente nas hemácias foi feito com água oxigenada 10 volumes (3%). O bloqueio das proteínas inespecíficas foi feito com imersão das lâminas em caseína diluída em tampão fosfato pH 7,4 (Synth, São Paulo, Brasil) por 5 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas

com os anticorpos primários diluídos em 1% de albumina de soro bovino (BSA) por 24 horas a 4°C e, posteriormente, incubados com o anticorpo secundário SuperPicture Polímero HRP Conjugado (Invitrogen, Carlsbad, CA) e utilizado como cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha). Posteriormente, ocorreu a contracoloração com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha) para todos os casos.

Foram utilizados os seguintes anticorpos com as respectivas diluições e descrições: Anticorpo antitriptase 1:4000, monoclonal em camundongo, clone AA1; cód.: M7052; Dako (Glostrup, Denmarck); Anticorpo CD117, monoclonal em coelho - cód.: 117R16; Cell Marque, Rocklin, Califórnia, EUA. Para o anticorpo para CD-117, foi selecionada a diluição que melhor demonstrou sua positividade.

3.3.8 Quantificação das células tipo-Cajal

Também nesta fase, as lâminas foram estudadas sem que o observador tivesse conhecimento a qual grupo os cortes em análise pertenciam. Foi utilizada histomorfometria computadorizada por meio do sistema de análise de imagens *Axiovision 4,6* (Carl Zeiss, Alemanha), acoplado a microscópio *Axio imager A1* da mesma marca. Foram contadas as células tipo-Cajal (positivas para CD117) no interstício do miocárdio e, separadamente, as que estavam presentes no endocárdio e epicárdio. Foram medidas manualmente tanto as áreas do miocárdio (como mostrado na figura), quanto a área total de cada corte. Utilizou-se objetiva 5x de aumento para a medição da área e 20X para a contagem das células. Para identificarmos as CITC, foi utilizado o anticorpo CD117 (anti-c-kit), o qual identifica o receptor kit presente em CITC. No entanto, esse anticorpo marca, também, mastócitos. Por isso, foi feita marcação com anticorpos antitriptase, estes específicos para mastócitos. Sendo assim, para cada amostra do coração, eram estudadas duas lâminas, uma utilizando o

anticorpo CD117 e a outra com o anticorpo antitriptase. Portanto, foi realizada a contagem das células positivas para o CD117, as positivas para antitriptase e, posteriormente, foi realizada a subtração determinando realmente as células intersticiais do tipo-Cajal. A contagem foi realizada respeitando as camadas musculares (endocárdio, miocárdio e epicárdio), mas a quantidade de células nas camadas extramiocárdicas foi insignificante, por isso só analisamos o miocárdio.

Os dados foram analisados de 03 modos: 1) número de células no interstício do miocárdio/área do miocárdio; 2) número total de células/área do miocárdio; e 3) número total de células/área total do miocárdio.

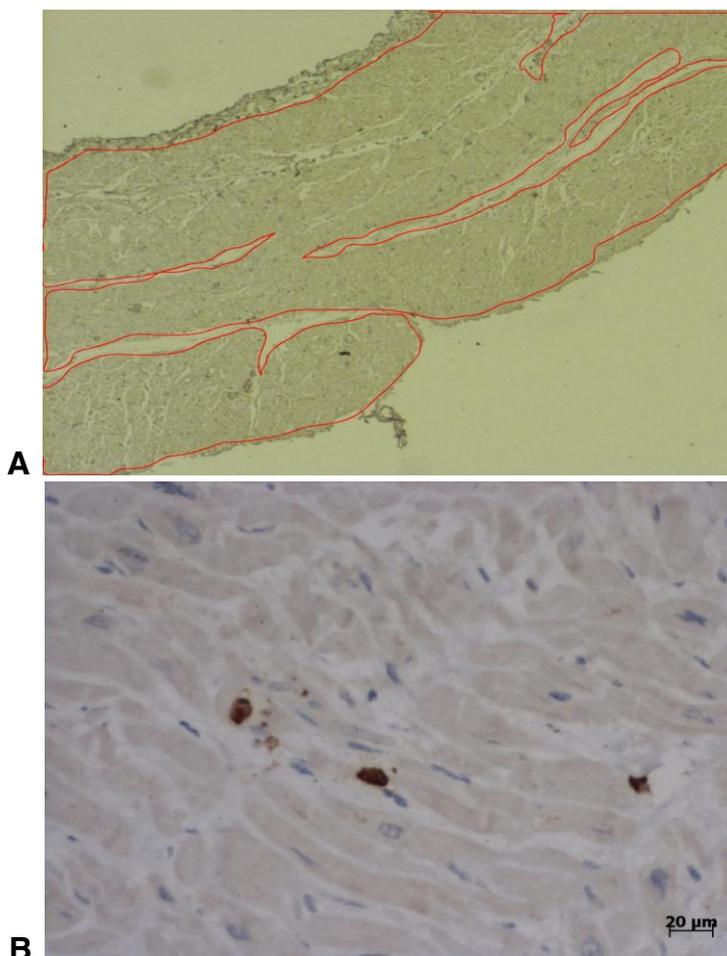


Figura 5 - Foto utilizando o sistema de análise de imagens Axiovision 4.6 (Carl Zeiss, Alemanha), acoplado a microscópio Axio imager A1 da mesma marca. A: Foto em aumento de 5x do miocárdio para medição da área do miocárdio. B: Foto em aumento 20x demonstrando a imagem das CITC durante a sua contagem.

3.3.9 Análise estatística

As características dos pacientes foram comparadas utilizando o teste *t* de Student ou Mann-Whitney. Com relação aos receptores adrenérgicos, foi feita comparação não só entre os dois grupos principais, mas também entre pacientes dos dois grupos que tomavam medicamentos β -bloqueadores e, também, comparamos os pacientes que tomavam o β -bloqueador com os que não tomavam, independente de terem ou não FA.

Os dados com distribuição normal foram apresentados em valor médio e desvio padrão (dp), e dos dados sem distribuição normal em mediana.

O nível de significância adotado neste estudo foi 0,05 e o programa estatístico para efetuar os cálculos foi o *SigmaStat for Windows*, versão 3.5.

3.3.10 Aspectos éticos

O estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, da referida instituição, sob Parecer de número 890/07 e obedeceu aos critérios éticos impostos pela Resolução N° 196, de 10 de outubro de 1996, revogada em dezembro/2012, passando a vigorar a Resolução N° 466/12, que regulamenta as pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil.

3.3.11 Financiamento

Esta pesquisa foi financiada, em sua maior parte, pela Funcap – Fundação Cearense de Apoio e Desenvolvimento Científico e Tecnológico, sob título de projeto “Doutorado Interinstitucional em Cardiologia USP/UECE/UFC”, sob Processo n° MD1-0053-00037.01.00/12.

Também foi recebida verba pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, sob o título de projeto “Identificação e caracterização da inervação autonômica atrial e suas implicações na fibrilação atrial”, sob Processo n° 2007/56648-8.

3.4 Resultados

Os resultados referentes às CITC demonstraram não haver alterações estatisticamente significantes entre os grupos estudados, mesmo quando avaliamos o número de células positivas no miocárdio pela área do miocárdio em mm², o número de células positivas no corte inteiro pela área do miocárdio em mm² ou o número de células positivas no corte inteiro/área do corte inteiro em mm² em relação a cada corte individualmente, o átrio esquerdo isoladamente (AE1 + AE2) e todos os cortes juntos. Tais resultados são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Comparações entre os grupos em relação ao número de células positivas para CITC

	N° de células positiva		
	I (c/FA)	II (s/FA)	p - valor
Células positivas do miocárdio/área do miocárdio (mm ²)	0,82 (1,23)	0,03 (0,08)	0.24
Células positivas do corte inteiro/área do miocárdio (mm ²)	1,02 (1,65)	0,15 (0,30)	0.82
Células positivas do corte inteiro/área do corte inteiro (mm ²)	0,75 (1,20)	0,09 (0,16)	0.82

Dados em estimativas de média e desvio padrão entre parênteses. I – Grupo I com FAP e II – Grupo II sem FAP. * - Teste estatisticamente significativo.

3.5 Discussão

A importância da FA já foi comentada em vários pontos desta tese, uma vez que é a arritmia sustentada mais comum da prática clínica e também porque a sua fisiopatologia ainda não é totalmente compreendida, o que torna um desafio o seu tratamento⁶⁸. Além do sistema nervoso autônomo, simpático e parassimpático, envolvidos na gênese e manutenção da FA, já é sabido que existem vários outros fatores envolvidos e, dentre eles, as células intersticiais tipo de Cajal, semelhantes às células intersticiais, que contribuem para a atividade motora peristáltica do trato gastrointestinal^{49,69}

As veias pulmonares são descritas na literatura como fonte de ectopias geradoras de FA. Isso pode ser comprovado com o sucesso no tratamento da FA através da ablação por cateter, seja por radiofrequência ou crioablação, como demonstrado em muitos estudos nos últimos anos, quando se promove o isolamento elétrico das VP com eliminação dos focos ectópicos. A origem dessas ectopias anormais provenientes das veias pulmonares é controversa, mas sabemos que existem proeminências da musculatura atrial para o interior das VP¹⁹.

Em 2005, tivemos os primeiros relatos da existência de células semelhantes às células intersticiais de Cajal, que são responsáveis pela atividade de marca-passo dos músculos gastrointestinais ao longo do trato digestivo, no miocárdio atrial e ventricular⁶⁷, e que elas poderiam corresponder a até 1,5% do volume atrial⁶⁶, passando a ser denominadas de células intersticiais tipo-Cajal⁶⁷.

Morel E *et al.* foram os primeiros a demonstrar a presença das CITC nas VP em coração humano. Eles analisaram oito corações de adultos humanos obtidos de necropsias realizadas de janeiro até dezembro de 2005 e encontraram CITC em três, sendo dois desses portadores de FA⁶⁸.

A escolha da área do corte anatômico nos diferentes corações não foi aleatória. No átrio esquerdo, há duas regiões mais importantes a serem analisadas: a porção média do trajeto da VoAe, a qual foi definida em vários

trabalhos como ligamento repleto de inervação cardíaca intrínseca⁵⁹, e a junção da veia pulmonar superior esquerda com o átrio esquerdo, na qual há evidências que demonstraram descontinuidades e desconexões miocárdicas com possível potencial reentrante³⁵; além disso, as veias pulmonares são a principal fonte de focos ectópicos deflagradores da fibrilação atrial¹⁹. Como já existem dados na literatura com descrição da presença das CITC nas VP, optamos por analisar a porção média do trajeto da VoAe.

Apesar de constar na literatura dados demonstrando a presença das CITC no miocárdio atrial e, em especial, nas veias pulmonares⁶⁶⁻⁶⁸, em nosso estudo, não conseguimos evidenciar diferença estaticamente significativa da positividade das CITC quando comparamos o grupo dos pacientes com FA e sem FA, mesmo realizando a análise separadamente entre as camadas musculares.

Esse resultado negativo pode ser secundário a diversos fatores, dentre eles, por se tratar de fibrilação atrial permanente, o que, sabidamente, leva a uma mudança na característica da FA, se tornando de menor importância os fatores deflagradores e sobressaindo o mecanismo de reentrada.

Os mesmos autores que descreveram inicialmente essas células com características semelhantes às células intersticiais de Cajal, existentes no trato digestivo, atualmente, as denominam de "telócitos" (TC). A característica fundamental que distingue os TC de qualquer outra célula é o prolongamento extremamente longo e fino denominado de telópode⁽⁶⁰⁾. Popescu *et al.*, além de mudarem o nome de CITC para TC, também comentam que o papel dessas células parece estar ligado à produção de colágeno no eixo do fator de crescimento transformante beta. E como mostrado no trabalho de Oliveira *et al.* que a fibrose não seja tão importante na FA, e, desta forma, as CITC, atualmente chamadas de TC, também não. Esses novos achados podem corroborar com os nossos resultados, visto que, as CITC estudadas nos corações que foram pareados pelas cardiopatias diferindo apenas na presença ou não de FA e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

3.5.1 Reflexões sobre as limitações do estudo

O tamanho da amostra foi muito pequeno, no entanto, tivemos dificuldade na obtenção de novos espécimes; e na escolha do tipo de FA, visto que as evidências mostram os fatores deflagradores são mais importantes na forma paroxística e não na permanente.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por se tratar de estudo que analisou todos os subtipos dos receptores β -adrenérgicos e da quinase-5 do receptor adrenérgico acoplado à proteína G em corações humanos na FAP, ele demonstrou não existir relação entre a expressão destes receptores e a presença desta arritmia. Além disso, foi observado que o uso de β -bloqueador também não altera a expressão dos receptores estudados.

A técnica utilizada é adequada, visto que foi utilizada por Oliveira, que demonstrou a relação entre a expressão de alguns subtipos de receptores muscarínicos, em especial, o M1, e a FA²⁹.

Análise das células intersticiais tipo-Cajal também demonstrou não existir a relação entre a presença dessas células e a FA. Isso pode corroborar com alguns trabalhos publicados recentemente por Popescu *et al.*, que, atualmente, as denominam de "telócitos" e que papel dessas células parece estar ligado à fibrose⁶⁰. E, como mostrado no trabalho de Oliveira *et al.*, que a fibrose não seja tão importante na FA²², e, desta forma, as CITC, atualmente chamadas de TC, também não.

5 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a imuno-histoquímica é capaz de demonstrar a expressão dos receptores muscarínicos e adrenérgicos, e que a expressão dos receptores adrenérgicos na FAP não está alterada.

Análise das células intersticiais tipo-Cajal também sugere não existir a relação entre a presença dessas células e a FA, porém se faz necessário estudos de maior tamanho amostral para uma melhor definição.

6 ANEXOS

6.1 Anexo A – Aprovação da Comissão de Ética Médica

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. Quila 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

Recebido
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 Ovidio 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

7 REFERÊNCIAS

1. 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;155:469-73.
2. Kannel W, Abbot R, Savage D, McNamara P. Epidemiologic Features of chronic atrial fibrillation. The Framingham Study. *N Engl Med.* 1982;306:1018-22.
3. Benjamin E, Levy D, Vaziri S, D'Agostino R, Belanger A, Wolf P. Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort: the Framingham Heart Study. *JAMA.* 1994;271:840-4.
4. Middlekauff H, Stevenson W, Steveson L. Prognostic significance of atrial fibrillation in advanced heart failure: a study of 390 patients. *Circulation.* 1991;84:40-8.
5. Martinelli Filho M, Zimerman LI. *Bases fisiopatológicas das arritmias cardíacas - SOBRAC.* Rio de Janeiro: Atheneu. Brasil. 2008. 248p.
6. Zimerman LI, Martinelli Filho M, Grupi C, Atié J, Lorga Filho A, D'Ávila A, et al. Diretrizes Brasileiras de Fibrilação Atrial. *Arq Bras Cardiol.* 2009;92(6 supl.1):S1-39.
7. Moreira DAR. *Fibrilação atrial.* 2 ed. São Paulo: Lemos Editorial. 2005. 311p.
8. Lip G, Beevers D. ABC of atrial fibrillation. History, epidemiology and importance of atrial fibrillation. *Br Med J.* 1995;311:1361-3.
9. Fuster V, Ryden L, Cannom D, Crijns H, Curtis A, Ellenbogen K, et al. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: Full text: A report of the American College of Cardiology/ American Heart Association Task Force on practice guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guideline of Patients with atrial Fibrillation) developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Europace.* 2006;8(9):651-745.

10. Kannel W, Benjamin E. Status of the epidemiology of atrial fibrillation. *Med Clin N Am*. 2008;92(1):17-40.
11. Oliveira L, Mallmann F, Botelho F, Paul L, Gianotto M, Abt Rde B, et al. Cross-section study of treatment strategies on atrial fibrillation. *Arq Bras Cardiol*. 2011;98(3):195-202.
12. Miyasa Y, Barnes M, Gersh B, Cha S, Bailey K, Abhayaaratna W, et al. Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence. *Circulation*. 2006;114(12):19-25.
13. Tsang T, Petty G, Barnes M, O'Fallon WM, Bailey KR, Wiebers DO, 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.
14. Chen L, Shen W. Epidemiology of atrial fibrillation: A current perspective. *Heart Rhythm*. 2007;4:S2-6.
15. Jais P, Haissaguerre M, Shah D, Chouari S, Gencel L, Hocini M, et al. A focal source of atrial fibrillation treated by discrete radiofrequency ablation. *Circulation*. 1997;95:572-6.
16. Lin W, Prakash V, Tai C, Hsieh MH, Tsai CF, Yu WC, 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;101:1274-81.
17. Atienza F, Jalife J. Reentry and atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2007;4:S13-6.
18. Sherlag B. The re-entry concept as the basis for clinical arrhythmias. *Arch Inst Cardiol Mex*. 1991;61:465-73.
19. Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah D, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, et al. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med*. 1998;339:659-66.
20. Boos C, Anderson R, Lip G. Is atrial fibrillation an inflammatory disorder? *Eur Hear J*. 2006;27:136-49.

21. Everett T, Olgin J. Atrial fibrosis and the mechanisms of atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2007;4:S24-6.
22. Oliveira I, Oliveira B, Scanavacca M, Gutierrez P. Fibrosis, myocardial crossings, disconnections, abrupt turns, and epicardial reflections: do they play an actual role in human permanent atrial fibrillation? A controlled necropsy study. *Cardiovasc Pathol*. 2013;22(1):65-9.
23. Smorodinova N, Lantová L, Bláha M, Melenovský V, Hanzelka J, Pirk J, et al. Bioptic study of left and right atrial interstitium in cardiac patients with and without atrial fibrillation: interatrial but not rhythm-based differences. *PLoS One*. 2015;10(6):1-13.
24. Oliveira I. *Análise anatomopatológica do sistema nervosa autônomo cardíaco intrínseco na fibrilação atrial permanente* [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2011.
25. Pappone C, Santinelli V, Maguso F, Vicedomini G, Gugliotta F, Augello G, et al. Pulmonary vein denervation enhances long-term benefit after circumferential ablation for paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation*. 2004;109:327-34.
26. Oliveira I, Scanavacca M, Correia A, Sosa E, Aiello V. Anatomic relations of the Marshall vein: importance for catheterization of the coronary sinus in ablation procedures. *Europace*. 2007;9:915-9.
27. Doshi R, Wu T, Yashima M, Kim Y, Ong J, Cao J, et al. Relation between ligament of Marshall and adrenergic atrial tachyarrhythmia. *Circulation*. 1999;100:876-83.
28. West T, Landa J. Minimal mass required for induction of a sustained arrhythmia in isolated atrial segments. *Am J Physiol*. 1962;202:232-6.
29. Armour J, Murphy D, Yuan B, Macdonald S, Hopkins D. Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system. *Anatom Rec*. 1997;247:289-98.
30. Lu Z, Scherlag B, Lin J, Niu G, Fung KM, Zhao L, et al. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation: autonomic mechanism for atrial electrical remodeling induced by short-term rapid atrial pacing. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2008;1:184-92.

31. Ogawa M, Zhou S, Tan A, Song J, Gholmieh G, Fishbein MC, et al. Left stellate ganglion and vagal nerve activity and cardiac arrhythmias in ambulatory dogs with pacing-induced congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:335-43.
32. Patterson E, Po S, Scherlag B, Lazzara R. Triggered firing in pulmonary veins initiated by in vitro autonomic nerve stimulation. *Heart Rhythm.* 2005;2:624-31.
33. Bettoni M, Zimmermann M. Autonomic tone variations before de onset of paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation.* 2002;105:2753-9.
34. Tan A, Li H, Wachsmann-Hogiu S, Chen L, Chen P, Fishbein M. Autonomic innervation and segmental muscular disconnections at the human pulmonary vein-atrial junction. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:132-43.
35. Dimmer C, Tavernier R, Gjorgov N, Van Nooten G, Clement D, Jordaens L. Variations of autonomic tone preceding onset of atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol.* 1998;82:22-5.
36. Wen Z, Chen S, Tai C, Huang JL, Chang MS. Role of autonomic tone in facilitating spontaneous onset of typical atrial flutter. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:602-7.
37. Coccagna G, Capucci A, Bauleo S, Boriani G, Santarelli A. Paroxysmal atrial fibrillation in sleep. *Sleep.* 1997;20:396-8.
38. Herweg B, Dalal P, Nagy B, Schweitzer P. Power spectral analysis of heart period variability of preceding sinus rhythm before initiation of paroxysmal atrial fibrillation. *Am J Cardiol.* 1998;82:869-74.
39. Jayachandran J, Sih H, Winkle W, Zipes DP, Hutchins GD, Olgin JE. Atrial fibrillation produced by prolonged rapid atrial pacing is associated with heterogeneous changes in atrial sympathetic innervation. *Circulation.* 2000;101:1185-91.
40. Chang C, Wu T, Zhou S, Doshi R, Lee M, Ohara T, et al. Nerve sprouting and sympathetic hyperinnervation in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged right atrial pacing. *Circulation.* 2001;103:22-5.

41. Sharifov O, Fedorov V, Beloshapko G, Glukhov A, Yushmanova A, Rosenshtraukh L. Roles of adrenergic and cholinergic stimulation in spontaneous atrial fibrillation in dogs. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:483-90.
42. Amar D, Zhang H, Miodownik S, Kadish A. Competing autonomic mechanisms precede the onset of postoperative atrial fibrillation. *Am Coll Cardiol*. 2003;42:1262-8.
43. Schauerte P, Scherlag B, Pitha J, Scherlag MA, Reynolds D, Lazzara R, et al. Catheter ablation of cardiac autonomic nerves for prevention of vagal atrial fibrillation. *Circulation*. 2000;102:2774-80.
44. Ng J, Villuendas R, Cokic I, Schliamser JE, Gordon D, Koduri H, et al. Autonomic remodeling in the left atrium and pulmonary veins in heart failure: creation of a dynamic substrate for atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2000;4(3):388-96.
45. Strader C, Fong T, Underwood D, Dixon R. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:101-32.
46. Vatner D, Asai K, Iwase M, Ishikawa Y, Shannon RP, Homcy CJ, et al. β -adrenergic receptor-G protein-adenylyl cyclase signal transduction in the failing heart. *Am J Cardiol*. 1999;83(12A):80H-5H.
47. Wallukat G. The β -adrenergic receptors. *Herz*. 2002;27:683-90.
48. Bristow M, Hershberger R, Port J, Gilbert E, Sandoval A, Rasmussen R, et al. β -adrenergic pathways in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Circulation*. 1990;82(2suppl):12-25.
49. Atala M, Consolim-Colombo F. Influência dos polimorfismos dos genes dos receptores cardiovascular e no desenvolvimento das doenças cardiovasculares. *Rev Bras Hipertens*. 2007;14(4):258-64.
50. Brodde O, Michel M. Adrenergic e muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev*. 1999;51:651-90.
51. Dutra O. II diretriz Brasileira de Cardiopatia Grave. *Arq Bras Cardiol*. 2006;87(2):223-323.

52. Aiello V, Higuchi M, Lopes E, Lopes A, Barbero-Marcial M, Ebaid M. An immunohistochemical study of arterial lesions due to pulmonaryhypertension in patients with congenital heart defects. *Cardiol Young*. 1994;4:37-43.
53. Murphy N, Simpson C, Jhund P, Stewart S, Kirkpatrick M, Chalmers J, et al. A national survey of the prevalence, incidence, primary care burden and treatment of atrial fibrillation in Scotland. *Heart*. 2007;93:606-12.
54. Mamas M, Caldwell J, Chacko S, Garratt CJ, Fath-Ordoubadi F, Neyses L. A meta-analysis of the prognostic significance of atrial fibrillation in chronic heart failure. *Eur Heart J Fail*. 2009;11:676-83.
55. Gold P, Yui M, Mclean C, Finch S, Marshall T, Lambert GW, et al. Evidence for increase atrial sympathetic innervation in persistente human atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2006;29:821-9.
56. Singh J, Larson M, Levy D, Evans J, Tsuji H, Benjamin E. Is baseline autonomic tone associated with new onset atrial fibrillation?: Insights from the Framingham Heart Study. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2004;9:215-20.
57. Nasr I, Bouzamondo A, Hulot J, Dubourg O, Le Heuzey JY, Lechat P. Prevention of atrial fibrillation onset by β -blockers treatment in heart failure: a meta-analysis. *Eur Heart J Fail*. 2007;28(4):457-62.
58. Makino M, Inoue S, Matsuyama T, Ogawa G, Sakai T, Kobayashi Y, et al. Diverse myocardial extension and autonomic innervation on ligament of Marshall in humans. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006;17:594-9.
59. Popescu L, Fausone-Pellegrini M. TELOCYTES – a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *J Cell Mol Med*. 2010;14:729-40.
60. Sanders K, Koh S, Ward S. Interstitial cells of Cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol*. 2006;68:307-43.
61. Garcia-Lopez P, Garcia-Marin V, Martinez-Murillo R. Updating old ideas and recent advances regarding the Interstitial Cells of Cajal. *Brain Res Rev*. 2009;61:154-69.

62. Huizinga J, Zarate N, Farrugia G. Physiology, injury, and recovery of interstitial cells of Cajal: basic and clinical science. *Gastroenterology*. 2009;137:1548-56.
63. Isozaki K, Hirota S, Nakama A, Miyagawa J, Shinomura Y, Xu Z, et al. Disturbed intestinal movement, bile reflux to the stomach, and deficiency of c-Kit expressing cells in Ws/Ws mutant rats. *Gastroenterology*. 1995;109(2):456-64.
64. Takaki M. Gut pacemaker cells: the Interstitial Cells of Cajal (ICC). *J Smooth Muscle Res*. 2003;39(5):137-61.
65. Hinescu M, Gherghiceanu M, Mandache E, Ciontea SM, Popescu LM. Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in atrial myocardium: ultrastructural and immunohistochemical characterization. *J Cell Mol Med*. 2006;10(1):243-57.
66. Hinescu M, Popescu L. Intestinal Cajal-like cells (ICLC) in human atrial cells. *J Cells Mol Med*. 2005;9(4):972-5.
67. Morel E, Meyronet D, Thivolet-Bejuy F, Chevalier P. Identification and distribution of interstitial Cajal cells in human pulmonary veins. *H Rhythm*. 2008;5(7):1063-7.
68. Farrugia G. Interstitial cells of Cajal in health and disease. *Neurogastroenterol Motil*. 2008;20:54-63.