



PROVAS ACADÉMICAS
NA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA
INSTITUTO DE FORMAÇÃO AVANÇADA

Doutoramento:

Medicina

Nome do Aluno:

Mário João Martins Oliveira

Tema da Tese:

Bases moleculares e electrofisiológicas da influência da actividade autónoma na génese e manutenção da fibrilhação auricular paroxística

Área:

Medicina

Especialidade:

Fisiologia

Data da Defesa:

27-07-2010

Classificação:

Aprovado com Distinção e Louvor por Unanimidade

Júri:

Presidiu o Vice - Presidente do Conselho Científico da FMUL, Professor Doutor José Melo Cristino e estiveram presentes os vogais Doutores: Luís Augusto Pires Costa Providência, Universidade de Coimbra, Joaquim Adelino Correia Ferreira Leite Moreira, Universidade do Porto, Pedro Manuel Freire Costa, Universidade Nova de Lisboa, João Queiroz e Melo, Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental E.P.E., Mário Gastão Lopes, Fausto José da Conceição Alexandre Pinto e Maria Isabel Sousa Rocha, todos da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.



PROVAS ACADÉMICAS
NA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA
INSTITUTO DE FORMAÇÃO AVANÇADA

RESUMO

As propriedades electrofisiológicas auriculares são uma componente fundamental do substrato arritmico da fibrilhação auricular (FA), contribuindo para a ocorrência de circuitos de reentrada, com múltiplas ondas de propagação, através de actividade ectópica, da redução heterogénea dos períodos refractários efectivos (PRE) e da velocidade de condução na superfície auricular. A demonstração em humanos e em modelos experimentais da importância de focos arritmogénicos, localizados sobretudo nas veias pulmonares (VP), e da evidência de espirais (“rotores”) com condução fibrilhatória para o restante tecido auricular, permitiu reforçar o papel das características eléctricas das aurículas e VP na indução e manutenção de episódios de FA paroxística (FAP). As alterações da refractariedade local e da velocidade de condução dependem dos processos de transporte nos canais iónicos ao nível da membrana celular, da distribuição e função das junções de hiato (conexinas) e da arquitectura celular. Além disso, a FA *per se* pode causar uma sequência de modificações, num processo complexo de adaptação fisiopatológica das aurículas à actividade fibrilhatória envolvendo as correntes iónicas e as propriedades electrofisiológicas, designado por remodelagem auricular, que facilita não só a recorrência, como a perpetuação da arritmia. Diferentes estudos têm sugerido que o início, manutenção e interrupção da FA são dependentes de múltiplos factores que modificam as propriedades eléctricas das aurículas e VP, tornando complexa a definição do contributo dos diferentes mecanismos envolvidos na fisiopatologia desta arritmia. O Sistema Nervoso Autónomo (SNA) tem sido considerado como tendo um papel potencial na modulação das condições necessárias ao substrato electrofisiológico para a ocorrência de FA, sugerindo-se ter influência na arritmogénese das aurículas e VP, mas podendo também apresentar alterações da função autonómica resultantes da própria FA, num processo de remodelagem autonómica. A compreensão da base celular e da dinâmica complexa dos fenómenos moleculares, iónicos e electrofisiológicos subjacentes à génese da FA, bem como a sua relação com as flutuações da actividade autonómica, constituem uma área de importância crescente na investigação actual.

A FA representa uma das situações mais heterogéneas em arritmologia, envolvendo múltiplas causas e factores de risco, “triggers” e mecanismos de manutenção da arritmia num substrato electrofisiológico que tem sido associado à influência do SNA. A interacção complexa da actividade autonómica e coração pode explicar as dificuldades da análise e correlação entre os aspectos clínicos da FA e dados resultantes de modelos experimentais.

A inervação autonómica cardíaca intrínseca compreende pelo menos 7 plexos ganglionares que parecem actuar numa rede interactiva, e que apresentam maior concentração de terminações nervosas na parede posterior da aurícula esquerda (AE) e na zona de inserção das VP esquerdas. Apesar da evidência de que o SNA pode influenciar o substrato arritmogénico criando condições facilitadoras para a ocorrência de FA, tem sido aceite que a proporção de doentes que se integra num grupo específico de FA de etiologia

neurogénica é pequena, permanecendo controversa a importância da contribuição relativa dos sistemas simpático e parassimpático nas alterações electrofisiológicas e dos canais iónicos envolvidos na FA, e sua relação directa com o início, manutenção e interrupção da arritmia. Têm sido documentadas flutuações do tónus autonómico e da actividade reflexa envolvendo variações bruscas do SNA que culminam em episódios de FAP, admitindo-se que a ocorrência de “descargas” simpático-vagais possa ser particularmente pro-fibrilatória. Estudos recentes têm mesmo sugerido que, além da influência nas situações de FA isolada, o SNA possa desempenhar também um papel importante na ocorrência de FA em presença de cardiopatia subjacente. No entanto, permanecem controversos os dados relativos à dinâmica da actividade autonómica associada à génese da FAP. A nível cardiovascular, a disfunção da regulação autonómica pode associar-se a diversos distúrbios patológicos envolvendo incapacidade de adaptação cardiovascular e/ou, anomalias de reflexos cardiovasculares, que incluem a taquicardia sinusal em repouso, síndrome de taquicardia postural ortostática, hipotensão ortostática, hipertensão arterial, síncope neurocardiogénica ou arritmias cardíacas. No entanto, o papel atribuído aos reflexos arteriais e cardiopulmonares na mediação das alterações autonómicas observadas na FA permanece ainda pouco claro. A possibilidade de que a hiperactividade autonómica ao nível dos plexos ganglionares cardíacos, com repercussões importantes na electrofisiologia das aurículas e VP, possa ter um papel na génese dos episódios de FAP tem levado alguns centros a incluir a ablação dos plexos ganglionares na estratégia terapêutica da FA. O atingimento dos plexos ganglionares pelas lesões obtidas com energia de radiofrequência tem sido proposto como um dos mecanismos de sucesso na ablação do antro das VP. Também a eliminação de áreas onde se obtêm reflexos vagais durante as aplicações de radiofrequência parece associar-se a maior sucesso no tratamento ablativo da FA. Por outro lado, os resultados da desinervação vagal parcial mostraram redução, aumento ou mesmo efeito neutro na incidência de FA no pós-operatório de cirurgia cardíaca, o que evidencia a necessidade de melhorar a informação nos aspectos metodológicos desta abordagem terapêutica.

O desenvolvimento de modelos de investigação básica em colaboração com técnicas da experiência clínica que permitam interpretar fenómenos no âmbito da biologia molecular e electrofisiologia auricular associados ao papel da actividade autonómica na génese e manutenção da FA, poderá representar um contributo para a prevenção e tratamento desta arritmia. Nesta investigação procurámos contribuir para uma visão global e abrangente da influência autonómica na fisiopatologia da FAP numa perspectiva translacional. Abordámos a importância relativa de aspectos da electrofisiologia auricular na vulnerabilidade para indução e manutenção de FA e sua relação com a modulação da actividade do SNA, bem como o comportamento da actividade simpática e parassimpática durante manobras provocativas da função autonómica em doentes com FAP, e estudámos a influência directa do SNA nos fenómenos electrofisiológicos das aurículas e VP, na vulnerabilidade para FA e na expressão genética de proteínas dos canais iónicos e conexinas no modelo animal.

Os resultados dos estudos electrofisiológicos numa população de 50 doentes com FAP mostraram que, apesar de mais de 1 ano de episódios recorrentes de arritmia, em cerca de 30% dos casos não se induziu FA com o protocolo de estimulação auricular. Os valores médios dos PRE aumentaram da aurícula direita (AD) para o seio coronário (SC) proximal e distal, sendo significativamente mais altos no SC ($p < 0,01$), sem diferenças entre os grupos com e sem indução de FA relativamente aos valores de PRE medidos nos diferentes locais. No entanto, nos doentes com indução reprodutível de FA os valores de dispersão da refractariedade eram significativamente superiores (105 ± 78 ms vs 49 ± 20 ms; $p = 0,01$), sendo >40 ms em mais de 90% dos casos ($p = 0,05$). Por outro lado, não houve diferença significativa da dispersão da

refratariedade entre os grupos com indução de FA auto-limitada e FA mantida justificando intervenção terapêutica (82 ± 65 ms vs. 80 ± 55 ms, $p=NS$), sugerindo que **a manutenção da FA depende de outros factores além da dispersão da refratariedade**. A análise com regressão logística, para determinar a associação de variáveis clínicas, ecocardiográficas e electrofisiológicas com vulnerabilidade para FA, mostrou que **a dispersão da refratariedade auricular foi o único marcador de risco com valor predizente para inducibilidade de FA** ($p < 0.05$).

Noutro estudo, em que se evidenciou aumento dos intervalos de condução eléctrica auricular, da duração dos electrogramas e da actividade fraccionada em doentes com FAP (FAP vs. controlo, $p < 0.05$), apesar de ligeiras variações, não houve diferenças significativas na taxa de inducibilidade de FA durante modulação autonómica (56% em basal, 69% com manobras provocativas e 50% após bloqueio autonómico farmacológico, $p=NS$). Os resultados não mostraram alterações dos tempos de condução auricular durante estimulação autonómica aguda, mas **no grupo com indução de FA mantida houve um aumento significativo da condução interauricular ($p < 0.05$) e do tempo de activação auricular esquerdo ($p < 0.01$) induzido pela estimulação vagal. Além disso, ocorreu um aumento da heterogeneidade na duração dos electrogramas auriculares durante as manobras provocativas, abolido após bloqueio farmacológico do SNA**. Mostrámos também que, nestes doentes, **os PRE respondem de forma heterogénea à modulação autonómica**, diminuindo na AD durante estimulação vagal, mostrando maior redução no apêndice auricular direito (AAD) durante estimulação simpática em doentes com indução de FA, e aumentando no SC distal após bloqueio autonómico. **A dispersão da refratariedade auricular diminuiu significativamente após bloqueio farmacológico do SNA, sugerindo um papel protector potencial na modificação do substrato electrofisiológico relacionado com a vulnerabilidade para FA**.

Os resultados dos estudos da regulação cardiovascular durante manobras provocativas da função autonómica numa população de 90 doentes com FAP mostraram que durante a fase inicial do ortostatismo passivo, apesar de valores de pressão arterial (PA) basais semelhantes ao grupo de voluntários saudáveis, a PA tem uma subida mantida nos doentes, sem diferenças relativamente à frequência cardíaca. Na análise da variabilidade dos intervalos RR com transformada de *wavelets*, que permite a decomposição no domínio tempo-frequência, com respectiva caracterização e localização de alterações no equilíbrio do SNA, os doentes da FAP, quando comparados com o grupo controlo, tiveram valores de LF (relacionados com a modulação simpática) mais baixos em posição supina e durante os dois primeiros minutos de *stress* ortostático. Na banda HF (reflectindo actividade parasimpática), os valores foram mais baixos em posição supina e durante o movimento basculante da mesa de inclinação e a relação LF/HF (utilizada como um indicador do balanço simpático-vagal) foi também mais baixa durante o movimento de inclinação e no 2º minuto de ortostatismo. Durante a fase inicial de adaptação ao ortostatismo não correram diferenças significativas relativamente à variabilidade da PA sistólica. A análise com *wavelets* durante outras manobras provocativas que evocam alterações do fluxo autonómico simpático, evidenciou diferenças significativas no comportamento da banda LF da variabilidade da PA durante esforço isométrico manual e na resposta pressora ao frio, comparando com o grupo de indivíduos saudáveis. Estes resultados permitiram sugerir que **doentes com FAP apresentam um comportamento anormal do SNA na regulação cardiovascular**. Tendo em consideração a importância da actividade do SNA como um dos factores determinantes do baroreflexo, estudámos a função do baroreflexo arterial, em posição supina e durante o período de adaptação ao ortostatismo, utilizando o método sequencial e considerando como parâmetros o número de rampas da PA sistólica, a sensibilidade do baroreflexo e o índice de eficácia do baroreflexo. Demonstrámos que quando comparados com indivíduos saudáveis, **os**

doentes com FAP apresentam uma função do baroreflexo diminuída, com consequentes diferenças na resposta da PA.

Sendo consensual que respostas neurocardiogénicas durante o teste de inclinação são mais frequentes em jovens e atribuídas a reflexos autonómicos com predomínio da activação vasovagal, estudámos um grupo de idosos com FAP sem antecedentes de síncope, com o objectivo de avaliar a susceptibilidade para desencadear mecanismos reflexos associados a síncope neurocardiogénica. Durante o teste de inclinação a 70°, sem fármacos provocativos, ocorreram respostas positivas (vasodepressora ou mista) em 20,5% do grupo com FAP (26,3% do subgrupo sem cardiopatia associada) e em 23,5% do grupo controlo (28,5% do subgrupo sem cardiopatia associada), com síncope recorrentes de etiologia desconhecida e sem história de FA (p=NS), sendo o tempo decorrido até à síncope/pré-síncope semelhante nos dois grupos (15,8±8 vs. 16±9 minutos, FAP e controlo, respectivamente; p=NS). Em 3 casos com FAP (8,8%) registaram-se também períodos auto-limitados de FA durante o teste de inclinação, sugerindo que **além de contribuir para a ocorrência dum número significativo de reacções reflexas neurocardiogénicas, a modulação autonómica também possa influenciar o aparecimento de FAP** naquelas condições.

Os trabalhos que avaliaram o impacto da estimulação autonómica aguda no substrato electrofisiológico e vulnerabilidade para FA, realizados em 50 coelhos com inervação cardíaca preservada, permitiram validar este modelo *in vivo* no estudo da interacção do SNA com a fisiopatologia da FA. Os resultados mostraram que, em condições basais, os PRE das VP, AD e AAD são inferiores aos medidos na AE e apêndice auricular esquerdo (AAE), registando-se um atraso da condução auricular na activação da AD para as VP (variável durante estimulação autonómica), com uma taxa de inducibilidade de FA entre 35% e 50%, de acordo com o local de estimulação rápida, e uma duração média de 1.0 a 2.6 s. Durante estimulação vagal, o intervalo de condução interauricular aumentou significativamente, os PRE diminuíram nos locais auriculares avaliados, sem aumento na dispersão da refractariedade, e a taxa de indução e a duração de FA variaram de 65% a 100% (p <0.05), e de 3.6 s a 14.0 s (p <0.01), respectivamente. Documentaram-se episódios de taquicardia das VP em 8% das experiências. Em 70% dos episódios de FA com duração >10 s a arritmia cessou imediatamente após interrupção da estimulação vagal. Com estimulação simpática, os intervalos de condução auricular diminuíram, os PRE tiveram redução significativa no AAE, e a inducibilidade e duração de FA variaram entre 65% e 76% (p=NS) e 1.8 s a 9.6 s (p <0,05), respectivamente. A estimulação simpático-vagal aumentou o tempo de condução interauricular, diminuiu os PRE nos locais avaliados e aumentou a taxa de inducibilidade e duração de FA para 75% a 100% (p <0.05) e 3.5 s a 6.0 s (p <0.05), respectivamente. O recurso a este modelo *in vivo* mostrou que a **estimulação autonómica aguda modifica a refractariedade auricular e das VP, e a velocidade de condução no tecido auricular, potenciando a indução e a duração de FA.**

O estudo da expressão genética de canais iónicos e conexinas auriculares, efectuado em 150 ratos submetidos a *pacings* auricular de alta-frequência ou estimulação autonómica de curta-duração, mostrou uma diminuição da expressão genética da Cx43 e Cx40 em ambas as aurículas aos 30 mn de *pacings*. Aos 30 mn de *pacings* rápido ocorreu diminuição significativa da expressão do RNAm relacionado com SCN5A, KCND2 e CACNA1 em ambas as aurículas, do KCNJ3 na AE e do KCND3 na AD. Após 2 horas de *pacings* os níveis de expressão de SCN5A e CACNA1 diminuíram na AE, e os do KCND3 diminuíram na AD. Às 4 horas de *pacings* auricular rápido a redução da expressão genética foi significativa para o SCN5A e CFTR em ambas as aurículas, para os genes KCNJ3, KCNJ6, KCND3 e KCNA5 na AD e para o

CACNA1 na AE, enquanto na AE se obteve um aumento da expressão genética de KCNJ6 e KCND3. Nestas condições experimentais não houve alterações significativas dos níveis de RNAm que codificam o KCNJ6 e o KCND3 na AE.

Com estimulação autonómica contínua de curta-duração induziram-se também alterações significativas na expressão proteica da conexina 43 e de canais iónicos do tecido auricular. A expressão da Cx43 aumentou na AE com estimulação simpática e diminuiu em ambas as aurículas com estimulação vagal ou simpático-vagal. Não se obteve variação significativa na expressão auricular da Cx40. A estimulação simpática aumentou os níveis de SCN5A na AE e os de KCND2 na AE e AD após 2 horas, e aumentou os de SCN5A, KCND2, KCND3, KCNA5, KCNJ3 e CACNA1 em ambas as aurículas após 4 horas. A estimulação vagal diminuiu a expressão de KCNA5 nas duas aurículas e de KCNJ3 na AD após 2 horas, e induziu aumento biauricular da expressão de KCNA5, com variações significativas heterogéneas do KCND2, KCND3, SCN5A e CACNA1 após 4 horas. Decorridas 2 horas de estimulação simpático-vagal combinada, aumentou a expressão de CACNA1 e diminuiu a de KCND3 na AD e AE, enquanto diminuiu a de KCNA5 na AE e a de KCNJ3 na AD. Às 4 horas de estimulação simpático-vagal, houve aumento da expressão de CACNA1 na AD e de SCN5A e KCNA5 nas duas aurículas, e diminuição do KCND3 na AE e do KCND2 na AD. Não se obtiveram alterações significativas dos níveis de expressão do gene CFTR. As variações da expressão genética induzidas pela estimulação autonómica foram de maior intensidade na AE após 2 horas e na AD após 4 horas.

O *pac*ing auricular de alta-frequência e a estimulação autonómica induzem alterações precoces, extensas e heterogéneas na expressão das conexinas e canais iónicos auriculares. As modificações obtidas com a estimulação vagal e simpático-vagal combinada apresentam um padrão sobreponível ao verificado no processo de remodelagem associado à estimulação auricular de alta-frequência.

A investigação continuada nesta vertente fundamental da abordagem da fisiopatologia da FAP permitirá melhorar a compreensão dos múltiplos mecanismos funcionais que constituem a base electrofisiológica da génese e manutenção desta arritmia, e dos fenómenos complexos da remodelagem, de forma a desenvolver metodologias de prevenção e tratamento com maiores níveis de eficácia e segurança.

Publicações

Mario Oliveira, M. Nogueira da Silva, Ana T. Timoteo, Joana Feliciano, Lidia Sousa, Sofia Santos, Fernando Marques, Rui Ferreira. Dispersão da Refratariedade Auricular como Substrato Electrofisiológico da Vulnerabilidade Auricular em Doentes com Fibrilhação Auricular Paroxística. Rev Port Cardiol 2007; 26 (7-8):1-12

Mario Oliveira, M. Nogueira da Silva, Ana T. Timoteo, Joana Feliciano, Lidia Sousa, Sofia Santos, Luis Silva-Carvalho, Rui Ferreira. Inducibility of atrial fibrillation during electrophysiologic evaluation is associated with increased dispersion of atrial refractoriness. Int J Cardiol 2009; 136:130-135

Mario Oliveira, M. Nogueira da Silva, Joana Feliciano, Ana T. Timoteo, Fernando Marques, Sofia Santos, Isabel Rocha, Luis Silva-Carvalho, Rui Ferreira. Influência da Estimulação e Bloqueio do Sistema Nervoso Autónomo na Refratariedade Auricular em Doentes com Fibrilhação Auricular Paroxística Idiopática. Rev Port Cardiol 2009;

Mário Oliveira, M. Nogueira da Silva, Pedro Cunha, Ruben Ramos, Fernando Marques, Sofia Santos, Isabel Rocha, Luis Silva-Carvalho, Rui Ferreira. Effects of acute autonomic modulation on atrial conduction delay and local electrograms duration in paroxysmal atrial fibrillation. *Int J Cardiol* 2010, Mar 16. doi:[10.1016/j.ijcard.2010.02.006](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.02.006)

Mário Oliveira, M. Nogueira da Silva, Ana Timóteo, Joana Feliciano, Sofia Silva, Rita Xavier, Isabel Rocha, Luis Silva-Carvalho, Rui Ferreira. Alterações da actividade autonómica durante o teste de inclinação em doentes com fibrilhação auricular paroxística: análise com *wavelets*. *Rev Port Cardiol* 2009; 28 (3):243-257

Mário Oliveira, Joana Feliciano, Ana Timóteo, M. Nogueira da Silva, Eduardo Antunes, Sofia Silva, Sandra Alves, Luis Silva-Carvalho, Rui Ferreira. Incidência de “Falsos-positivos” em Idosos com Fibrilhação Auricular Paroxística Submetidos a Teste de Inclinação. *Rev Port Cardiol* 2008; 27 (11):1383-1394

Mário Oliveira, M. Nogueira da Silva, Vera Geraldés, Rita Xavier, Sérgio Laranjo, Vitor Silva, Gabriela Postolache, Rui Ferreira, Isabel Rocha. Acute vagal modulation of atrial and pulmonary veins electrophysiology increases vulnerability to atrial fibrillation
Experimental Physiology (*in press*)

Mário Oliveira, M. Nogueira da Silva, Vera Geraldés, Gabriela Postolache, Rita Xavier, Sérgio Laranjo, Isabel Rocha, Rui Ferreira, Luís Silva-Carvalho. Impacto da estimulação vagal na indução e interrupção de fibrilhação auricular no modelo do coração de coelho *in vivo*. *Rev Port Cardiol* 2010; 29 (03): 375-389