UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

FERNANDO FONSECA FRANÇA RIBEIRO

Avaliação da deformação miocárdica do ventrículo esquerdo pela técnica ecocardiográfica de *speckle tracking* em um modelo experimental animal de doença de Chagas.

Ribeirão Preto

2018

FERNANDO FONSECA FRANÇA RIBEIRO

Avaliação da deformação miocárdica do ventrículo esquerdo pela técnica ecocardiográfica de *speckle tracking* em um modelo experimental animal de doença de Chagas.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Clínica Médica

Opção: Investigação Clínica

Orientadora: Prof. Dra. Minna Moreira Dias Romano

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e a divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Ribeiro, Fernando Fonseca França

Avaliação da deformação miocárdica do ventrículo esquerdo pela técnica ecocardiográfica de *speckle tracking* em um modelo experimental animal de doença de Chagas/ Fernando Fonseca França Ribeiro / Orientadora: Minna Moreira Dias Romano - Ribeirão Preto, 2018.

74f.: 12il. 30cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Clínica Médica

Orientadora: Prof. Dra. Minna Moreira Dias Romano

Nome: RIBEIRO, Fernando Fonseca França

Título: Avaliação da deformação miocárdica do ventrículo esquerdo pela técnica ecocardiográfica de *speckle tracking* em um modelo experimental animal de doença de Chagas.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Clínica Médica

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedicatória

À minha esposa, Luisa, pelo apoio incondicional.

*Aos meus pais, Walter e Enóe, que me ensinaram
a importância do estudo e do trabalho.*

*Aos meus irmãos, Walter Júnior e Renan, pelo
companheirismo.*

Agradecimientos

Agradeço,

A Deus, sempre presente na minha vida.

À minha família.

À minha orientadora, Profa. Dra. Minna Moreira Dias Romano.

Aos Docentes da Divisão de Cardiologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos meus colaboradores de pesquisa Antonio Carlos Leite de Barros Filho e Denise Mayumi Tanaka.

Aos médicos assistentes da Divisão de Cardiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial ao Dr. Luis Gustavo Gali e aos funcionários do laboratório de ecocardiografia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos funcionários do laboratório de cirurgia experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A todos os colaboradores deste projeto.

Aos meus colegas e amigos.

Resumo

RESUMO

RIBEIRO, F.F.F. **Avaliação da deformação miocárdica do ventrículo esquerdo pela técnica ecocardiográfica de *speckle tracking* em um modelo experimental animal de doença de Chagas.** 2018. 74f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2018.

Ferramentas diagnósticas capazes de detectar envolvimento cardíaco precoce na doença de Chagas são necessárias. A técnica ecocardiográfica de rastreamento de pontos, ou *speckle tracking echocardiography* (STE) oferece condições para o diagnóstico precoce de lesão cardíaca por avaliar a deformação miocárdica (*strain*). O objetivo do estudo foi avaliar as alterações sequenciais de parâmetros estruturais e funcionais dos ventrículos na evolução da doença. Um total de 37 hamsters fêmeas (*Mesocricetus auratus*) adultas receberam, por via intraperitoneal, 35.000 formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (grupo Chagas) e outras 20 receberam igual volume de solução salina (grupo controle). Ecocardiograma foi realizado imediatamente antes da infecção (exame basal) e repetido para avaliação das fases aguda (1 mês) e crônica (4, 6 e 8 meses após). Foram avaliados: diâmetros do ventrículo esquerdo (DDFVE e DSFVE), fração de ejeção (FEVE), *strain* longitudinal (GLS), circunferencial (GCS) e radial (GRS) do ventrículo esquerdo e TAPSE, índice de função sistólica do ventrículo direito. A avaliação das diferenças entre os dois grupos ao longo de tempo foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) para modelos mistos de medidas repetidas. Ao exame basal, os dois grupos apresentaram idade média de 89 ± 1 dias. Os animais do grupo controle apresentaram peso de 130 ± 15 gramas; frequência cardíaca de 204 ± 18 batimentos/minuto, enquanto os do grupo Chagas apresentaram peso de 143 ± 12 gramas e frequência cardíaca de 198 ± 18 batimentos/minuto. Os valores de peso foram significativamente diferentes ($p=0,004$) entre os grupos, mas não os de frequência cardíaca. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi de $64 \pm 5\%$ no grupo controle e de $61 \pm 5\%$ no grupo Chagas, $p=0,10$, enquanto o GLS foi de $-15,2 \pm 2,7\%$ no grupo controle e de $-14,2 \pm 3,4\%$ no grupo Chagas, $p=0,25$. Na evolução da doença, o grupo Chagas apresentou aumento do DSFVE significativamente maior do que o aumento mostrado pelo grupo controle (valor-p da interação grupos#tempo= 0,007); a FEVE mostrou queda progressiva ao longo do tempo no grupo Chagas, com diferença verificada entre os grupos a partir de 6 meses do exame basal (valor-p da interação grupos#tempo= 0,005). O GLS e o GCS dos animais do grupo Chagas apresentaram comportamento significativamente diferente ao longo do tempo em comparação com o grupo controle (valor-p da interação grupos#tempo= 0,003 para o GLS e $<0,001$ para o

GCS). Para ambos, a diferença entre os grupos é verificada a partir do primeiro mês, quando se detecta queda pronunciada desses parâmetros de deformação. O índice TAPSE do grupo Chagas apresentou comportamento significativamente diferente ao longo do tempo em comparação ao grupo controle (valor-p da interação grupos#tempo < 0,009), com diferença observada a partir do primeiro mês. Diante disso, os resultados revelam que o GLS e o GCS são os parâmetros mais sensíveis para a avaliação funcional do ventrículo esquerdo na fase aguda e na fase crônica da doença de Chagas no modelo estudado.

Palavras-chave: Ecocardiografia. Rastreamento de pontos. Chagas. Hamsters. Modelo experimental.

Abstract

RIBEIRO, F.F.F. Assessment of left ventricular myocardial strain using speckle tracking echocardiography in an animal model of Chagas disease. 2018. 74f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2018

Diagnostic tools capable to detect early heart involvement in Chagas' disease are necessary. The speckle tracking echocardiography (STE) provides conditions for early diagnosis of cardiac lesion by evaluating myocardial deformation (strain). The objective of this study was to evaluate the sequential changes of structural and functional parameters of the ventricles in the evolution of the disease. A total of 37 adult female hamsters (*Mesocricetus auratus*) were inoculated intraperitoneally with 35,000 trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* (Chagas group) and another 20 received equal volume of saline solution (control group). Echocardiography was performed before the infection (baseline) and repeated for assessment of acute (1 month) and chronic (4, 6 and 8 months after) phases. Left ventricular end-diastolic (LVED), left ventricular end-systolic (LVES), left ventricular ejection fraction (LVEF) and longitudinal strain (GLS) were measured at parasternal long-axis view. Circumferential strain (GCS) and radial strain (GRS) were evaluated at short-axis view (mid-LV cavity). Tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) was used to assess right ventricular function. The analysis of variance (ANOVA) for mixed models of repeated measures was used to evaluate the differences between the two groups over time. At baseline, the two groups had a mean age of 89 ± 1 days. The animals in the control group had a weight of 130 ± 15 grams; heart rate of 204 ± 18 beats/minute, while those in the Chagas group had a weight of 143 ± 12 grams and a heart rate of 198 ± 18 beats/minute. The weight values were significantly different ($p = 0.004$) between the groups, but not those of heart rate. Left ventricular ejection fraction was $64 \pm 5\%$ in the control group and $61 \pm 5\%$ in the Chagas group ($p = 0.10$), while GLS was $-15.2 \pm 2.7\%$ in the control group and of $-14.2 \pm 3.4\%$ in the Chagas group ($p = 0.25$). In the evolution of the disease, the Chagas group presented a significantly higher increase in the LVES than the increase shown by the control group (p -value of the interaction groups # time = 0.007); the LVEF showed progressive decrease over time in the Chagas group, with a difference between groups after 6 months of baseline examination (p -value of interaction groups # time = 0.005). The GLS and GCS of the animals of the Chagas group showed significantly different behavior over time compared to the control group (p -value of the interaction groups # time = 0.003 for GLS and <0.001 for GCS). For both, the difference between groups is verified from the first month, when a pronounced decrease of these deformation parameters is detected. The TAPSE index of the Chagas group presented a significantly different behavior over time compared to the control group (p -value of interaction groups # time <0.009), with difference observed from the first month. Therefore, the results indicate that GLS and GCS are the most sensitive parameters for left ventricle functional assessment in acute and chronic phases of an experimental model of Chagas disease.

Key-words: Echocardiography. Speckle tracking. Chagas. Hamsters. Experimental model.

FIGURA 1 - HISTÓRIA NATURAL DA DOENÇA DE CHAGAS.....	25
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DA DEFORMAÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS EIXOS RADIAL, CIRCUNFERENCIAL E LONGITUDINAL (DA ESQUERDA PARA A DIREITA).....	29
FIGURA 3- ESQUEMA DO DELINEAMENTO GERAL DO ESTUDO.....	38
FIGURA 4 - APARELHOS UTILIZADOS PARA A REALIZAÇÃO DO EXAME ECOCARDIOGRÁFICO. (A) EQUIPAMENTO DE ECOCARDIOGRAMA VEVO 2100. (B) TRANSDUTOR LINEAR DE 30 MHz.	39
FIGURA 5 - MESA COM SUPERFÍCIE AQUECIDA, INCLINÁVEL E COM QUATRO SUPERFÍCIES DE METAL PARA MONITORIZAÇÃO ELETROCARDIOGRÁFICA.	39
FIGURA 6 - MODO M GUIADO PELA IMAGEM BIDIMENSIONAL EM EIXO LONGO (A) E EIXO CURTO (B) EM HAMSTER. LVID; D- DIÂMETRO DIASTÓLICO FINAL DO VENTRÍCULO ESQUERDO (SETAS BRANCAS); LVID; S- DIÂMETRO SISTÓLICO FINAL DO VENTRÍCULO ESQUERDO (SETAS AMARELAS).	40
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO NOS CORTES PARAESTERNAL EIXO LONGO E PARAESTERNAL EIXO CURTO EM HAMSTERS. AS SETAS EM AMARELO INDICAM A DEFORMAÇÃO RADIAL; AS SETAS EM VERMELHO INDICAM A DEFORMAÇÃO LONGITUDINAL E AS SETAS EM AZUL INDICAM A DEFORMAÇÃO CIRCUNFERENCIAL.....	41
FIGURA 8 - ANÁLISE DA DEFORMAÇÃO ENDOCÁRDICA GLOBAL E SEGMENTAR NA JANELA PARAESTERNAL EIXO LONGO. (A) DEFORMAÇÃO RADIAL. (B) CURVAS DA DEFORMAÇÃO RADIAL. (C) DEFORMAÇÃO LONGITUDINAL. (D) CURVAS DA DEFORMAÇÃO LONGITUDINAL. SÃO REPRESENTADOS OS VALORES DE DEFORMAÇÃO ENDOCÁRDICA GLOBAL E PARA CADA UM DOS SEGMENTOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO.	42
FIGURA 9 - ANÁLISE DA DEFORMAÇÃO ENDOCÁRDICA GLOBAL E SEGMENTAR NA JANELA PARAESTERNAL EIXO CURTO. (A) DEFORMAÇÃO RADIAL. (B) CURVAS DA DEFORMAÇÃO RADIAL. (C) DEFORMAÇÃO CIRCUNFERENCIAL. (D) CURVAS DA DEFORMAÇÃO CIRCUNFERENCIAL. SÃO REPRESENTADOS OS VALORES DE DEFORMAÇÃO ENDOCÁRDICA GLOBAL E PARA CADA UM DOS SEGMENTOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO.	43
FIGURA 10 - MEDIDAS SEQUENCIAIS DO DDFVE DE DOIS GRUPOS DE HAMSTERS AO LONGO DO TEMPO. CÍRCULOS PREENCHIDOS REPRESENTAM AS MÉDIAS DO DDFVE, ENQUANTO AS BARRAS REPRESENTAM OS INTERVALOS DE PREDIÇÃO DE 95% PARA ESSA VARIÁVEL. DDFVE= DIÂMETRO DIASTÓLICO FINAL DO VENTRÍCULO ESQUERDO.	49
FIGURA 11 - MEDIDAS SEQUENCIAIS DO DSFVE DE DOIS GRUPOS DE HAMSTERS AO LONGO DO TEMPO. CÍRCULOS PREENCHIDOS REPRESENTAM AS MÉDIAS DO DSFVE, ENQUANTO AS BARRAS REPRESENTAM OS INTERVALOS DE PREDIÇÃO DE 95% PARA ESSA VARIÁVEL. DSFVE= DIÂMETRO SISTÓLICO FINAL DO VENTRÍCULO ESQUERDO.	50
FIGURA 12 - MEDIDAS SEQUENCIAIS DA FEVE DE DOIS GRUPOS DE HAMSTERS AO LONGO DO TEMPO. CÍRCULOS PREENCHIDOS REPRESENTAM AS MÉDIAS DA FEVE, ENQUANTO AS BARRAS REPRESENTAM OS INTERVALOS DE PREDIÇÃO DE 95% PARA ESSA VARIÁVEL. FEVE= FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO.....	51
FIGURA 13- MEDIDAS SEQUENCIAIS DO GLS DO VENTRÍCULO ESQUERDO DE DOIS GRUPOS DE HAMSTERS AO LONGO DO TEMPO. CÍRCULOS PREENCHIDOS REPRESENTAM AS MÉDIAS DO GLS, ENQUANTO AS BARRAS REPRESENTAM OS INTERVALOS DE PREDIÇÃO DE 95% PARA ESSA VARIÁVEL. OS VALORES DE <i>STRAIN</i> FORAM EXPRESSOS EM FORMA DE NÚMERO ABSOLUTO. GLS= <i>STRAIN</i> LONGITUDINAL GLOBAL.	52
FIGURA 14- MEDIDAS SEQUENCIAIS DO GCS DO VENTRÍCULO ESQUERDO DE DOIS GRUPOS DE HAMSTERS AO LONGO DO TEMPO. CÍRCULOS PREENCHIDOS REPRESENTAM AS MÉDIAS DO GCS, ENQUANTO AS BARRAS REPRESENTAM OS INTERVALOS DE PREDIÇÃO DE 95% PARA ESSA VARIÁVEL. OS VALORES DE <i>STRAIN</i> FORAM EXPRESSOS EM FORMA DE NÚMERO ABSOLUTO. GCS= <i>STRAIN</i> CIRCUNFERENCIAL GLOBAL.....	53
FIGURA 15- MEDIDAS SEQUENCIAIS DO GRS DO VENTRÍCULO ESQUERDO DE DOIS GRUPOS DE HAMSTERS AO LONGO DO TEMPO. CÍRCULOS PREENCHIDOS REPRESENTAM AS MÉDIAS DO GRS, ENQUANTO AS BARRAS REPRESENTAM OS INTERVALOS DE PREDIÇÃO DE 95% PARA ESSA VARIÁVEL. OS VALORES DE <i>STRAIN</i> FORAM EXPRESSOS EM FORMA DE NÚMERO ABSOLUTO. GRS= <i>STRAIN</i> RADIAL GLOBAL.	54
FIGURA 16 - MEDIDAS SEQUENCIAIS DO TAPSE DE DOIS GRUPOS DE HAMSTERS AO LONGO DO TEMPO. CÍRCULOS PREENCHIDOS REPRESENTAM AS MÉDIAS DO TAPSE, ENQUANTO AS BARRAS REPRESENTAM OS INTERVALOS DE PREDIÇÃO DE 95% PARA ESSA VARIÁVEL. TAPSE= <i>TRICUSPID ANNULAR PLANE SYSTOLIC EXCURSION</i>	55

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características demográficas, clínicas e ecocardiográficas basais.	47
Tabela 2 - Avaliação sequencial de estrutura e função dos ventrículos no grupo controle.....	47
Tabela 3 - Avaliação sequencial de estrutura e função dos ventrículos no grupo Chagas.....	48
Tabela 4 - Correlação entre inflamação e parâmetros ecocardiográficos.....	56

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Epidemiologia.....	21
1.2. Aspectos fisiopatológicos	22
1.3. História natural e aspectos clínicos da doença de Chagas	23
1.4. Avaliação da deformação miocárdica do ventrículo esquerdo	28
1.5. O ventrículo direito na doença de Chagas	30
1.6. Modelo experimental animal da doença de Chagas	31
1.7. Justificativa.....	32
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivo geral	35
2.2. Objetivos específicos	35
3. MÉTODOS.....	37
3.1. População de estudo	37
3.2. Protocolo experimental.....	37
3.3. Ecocardiograma	38
3.4. Análise histológica	43
3.5. Análise estatística	44
4. RESULTADOS	46
4.1. Número de animais estudados	46
4.2. Características da população de estudo	46
4.3. Avaliação sequencial dos parâmetros ecocardiográficos	47
4.4. Correlação dos índices de geometria e função sistólica de ventrículo esquerdo com alterações histológicas miocárdicas.....	55
5. DISCUSSÃO	58
6. LIMITAÇÕES	63
7. CONCLUSÃO.....	65
8. REFERÊNCIAS	67
9. ANEXO.....	74

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia

A doença de Chagas é uma protozoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). A doença de Chagas foi inicialmente descrita em 1909 por Carlos Chagas, quem caracterizou o parasita, seus vetores e deu início aos primeiros estudos sobre os aspectos clínicos da doença.

A doença de Chagas humana é uma doença infecciosa endêmica na América Latina, região onde mais de seis milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo protozoário. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os países com o maior número de pessoas infectadas no mundo são Argentina, Brasil, México e Bolívia (1). A OMS reconhece a doença de Chagas como uma das treze doenças tropicais mais negligenciadas no mundo, com grande quantidade de indivíduos, cerca de 25 milhões, sob risco de contrair a infecção, especialmente nas Américas do Sul e Central e responsável pelas mais elevadas taxas de mortalidade dentre todas elas (2). Embora a prevalência da doença de Chagas tenha apresentado discreto declínio ao longo da última década, ela chega a representar 11,4% de todas as causas de insuficiência cardíaca em algumas regiões endêmicas específicas do Brasil (3). Apesar de a doença de Chagas ser mais prevalente na América Latina, o importante fluxo migratório ocorrido nas últimas décadas tem contribuído para aumentar a prevalência da doença em outros países, sendo que, atualmente, um número alarmante de indivíduos com a doença pode ser encontrado fora dos países endêmicos (4). Nos Estados Unidos, por exemplo, estima-se que entre 300 mil e 1 milhão de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi* (5). Na Europa, a prevalência de doença de Chagas em imigrantes provenientes da América Latina é alta, ultrapassando 4%, embora a real estimativa do número de pessoas infectadas residindo nos países europeus não seja conhecida (6).

A cardiomiopatia dilatada é a mais grave manifestação da doença de Chagas, sendo caracterizada por arritmias ventriculares, distúrbios de condução, aneurismas ventriculares, eventos tromboembólicos, insuficiência cardíaca e morte súbita. A mortalidade precoce e a importante morbidade ocorrem frequentemente em adultos jovens, faixa etária economicamente mais produtiva. Estima-se que, em 2008, mais de 10 mil pessoas tenham evoluído a óbito em decorrência da doença de Chagas e 752 mil dias/ano foram perdidos devido à morte prematura (7) pela doença. Além disso, a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) usualmente requer tratamentos de longo prazo, incluindo cuidados especializados

como implante de marcapasso, cardiodesfibrilador implantável (CDI) e eventualmente transplante cardíaco, o que eleva os custos relacionados à doença (8). Portanto, a doença de Chagas é uma enfermidade com elevado impacto em saúde pública e com altos custos sócio-econômicos não só em países da América Latina, como também em vários outros países do mundo (7).

1.2. Aspectos fisiopatológicos

A doença de Chagas classicamente apresenta duas fases: aguda e crônica. As manifestações cardiovasculares na fase aguda são decorrentes de uma reação inflamatória intensa, secundária ao parasitismo das fibras cardíacas por ninhos da forma amastigota do *T. cruzi*, com infiltrado celular poli e mononuclear, edema intersticial, dano vascular e necrose de miócitos. Uma vez que a fase aguda cede, os pacientes entram na fase crônica da doença, cujas lesões histopatológicas são caracterizadas por miocardite focal, infiltrado inflamatório composto principalmente por células mononucleadas, destruição de miócitos e fibrose intersticial. Nessa fase o parasitismo de fibras cardíacas é de muito baixa intensidade (9).

A patogênese da CCC não está completamente elucidada, em parte porque a progressão da doença depende de complexas interações entre o hospedeiro e o parasita. Várias evidências têm apontado para a existência de quatro mecanismos fisiopatogênicos: distúrbios microvasculares, a disautonomia e dois mecanismos centrais, a saber: agressão miocárdica dependente do parasitismo persistente e de baixa intensidade no tecido cardíaco e lesão miocárdica mediada pelo sistema imune (9).

Anormalidades vasculares estruturais e funcionais estão presentes na cardiomiopatia chagásica, possivelmente associadas ao processo inflamatório subjacente que causa inflamação perivascular e lesões vasculares (9). Por conseguinte, as manifestações são vasoespasmos, redução do fluxo sanguíneo, isquemia focal, agregação plaquetária, formação de trombos e elevação dos níveis de tromboxane A-2 e endotelina-1, agentes classicamente relacionados à vasoconstrição (10-13). A isquemia microvascular resultante pode amplificar a agressão inflamatória crônica imposta ao tecido miocárdico. Diante disso, as distribuições focais de necrose celular e fibrose reparativa sugerem a participação de insultos isquêmicos microvasculares transitórios (10).

Existem, também, evidências patológicas e funcionais de denervação cardíaca na doença de Chagas. Vários estudos demonstraram intensa redução da população neuronal em pacientes com doença de Chagas, com dano ganglionar e redução absoluta no número de

neurônios intramurais subepicárdicos (9). Acredita-se que a perda neuronal na cardiopatia chagásica ocorra principalmente na fase aguda da infecção, por meio de insulto parasitário direto ao neurônio, inflamação periganglionar e reação autoimune anti-neuronal, resultando em regulação autonômica cardíaca anormal (14). A disautonomia parassimpática é um fenômeno precoce, podendo estar presente antes do surgimento da disfunção sistólica do ventrículo esquerdo (15), além de estar relacionada à vulnerabilidade aumentada às arritmias malignas e à morte súbita (16).

O processo inflamatório que caracteriza a cardiopatia chagásica é acentuado durante a fase aguda da doença. Após, o processo torna-se menos intenso e clinicamente silencioso, embora seja incessante durante a fase crônica (17, 18). A inflamação persistente, com consequente lesão celular, perda de miócitos e fibrose, parece se correlacionar com a gravidade da insuficiência cardíaca (19). Acredita-se que a persistência do parasita seja o gatilho para a infiltração linfocitária no miocárdio, uma vez que há estudos demonstrando a presença de antígenos e mesmo material genético do *T. cruzi* nos focos inflamatórios (20). A miocardite é uma característica patológica relevante nas diferentes fases evolutivas da doença de Chagas. Apesar de ser mais evidente na fase aguda, permanece incessante na fase crônica da doença (19). A miocardite difusa, com miocitólise e fibrose reparativa, é observada na CCC, configurando uma reação de hipersensibilidade tardia, com infiltrado inflamatório rico em células-T. Todavia, a escassez de parasitas e a falta de correlação temporal até o desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica apontam para a hipótese da autoimunidade e seus vários mecanismos associados: exposição antigênica decorrente do dano tecidual inicial; mimetismo molecular por epítomos do parasita estruturalmente semelhantes aos antígenos do hospedeiro, com consequente resposta autoimune por reação cruzada e ativação policlonal com produção de autoanticorpos (9, 21). Autoanticorpos específicos para vários autoantígenos expressos no coração, nervos e vários outros tecidos têm sido encontrados em modelos experimentais animais de infecção pelo *T. cruzi* e no soro de pacientes infectados (22). Assim, as evidências sugerem que a CCC seja um exemplo de reação autoimune pós-infecciosa em que o agente infeccioso *T. cruzi* é o gatilho para o mimetismo molecular relacionado ao dano imunológico de órgãos-alvo (23).

1.3. História natural e aspectos clínicos da doença de Chagas

A transmissão da doença de Chagas ocorre por meio de insetos triatomíneos infectados com o parasito, transfusões sanguíneas, transplante de órgãos, ingestão de material contaminado, transmissão vertical e contaminação acidental em laboratório (24). Como

mencionado anteriormente, a história natural da doença de Chagas é caracterizada por duas fases distintas: a fase aguda e a fase crônica (Figura 1). A fase aguda, caracterizada por graus elevados de parasitemia, com proliferação de formas amastigotas em vários órgãos, é usualmente oligossintomática, com aspectos de uma síndrome febril autolimitada (9) e diagnosticada em apenas 1-2% dos casos. Na fase aguda, embora cada vez mais raro de ser observado, pode haver evidência do local de entrada do *T. cruzi* através de uma intensa reação inflamatória local (“chagoma” de inoculação). Febre, mialgia, hepatoesplenomegalia, sinais de insuficiência cardíaca por miocardite, efusão pericárdica, linfocitose e meningoencefalite podem estar presentes. A taxa de mortalidade gira em torno de 1%, usualmente decorrente de miocardite ou meningoencefalite (25). O envolvimento cardíaco pode ocorrer em mais de 90% dos casos, com eletrocardiograma (ECG) demonstrando alguma anormalidade de condução, alterações difusas do segmento ST-onda T e baixa voltagem do complexo QRS (26). Testes sorológicos são negativos nas primeiras semanas, mas os parasitas circulantes podem ser detectados por xenodiagnóstico. O diagnóstico da fase aguda, contudo, é estabelecido em poucos pacientes, devido escassez de sintomas e manifestações clínicas. A fase aguda pode persistir por 4 a 8 semanas com recuperação espontânea em mais de 90% dos casos.

Figura 1 - História natural da doença de Chagas.

Fonte - Adaptado de *Lancet* 2010;375:1388-1402.

A fase crônica começa após a regressão de todo o processo inflamatório característico da primeira fase e é caracterizada por duas formas clínicas distintas: a forma indeterminada, que usualmente se instala de 4 a 10 semanas após a infecção; é definida por soropositividade e ausência de alterações radiológicas, eletrocardiográficas ou manifestações clínicas de doença cardíaca ou forma digestiva (27). A maior parte dos pacientes, portanto, permanece sem nenhuma evidência clínica de lesão em um determinado órgão ou sistema e a infecção pode ser detectada apenas por testes sorológicos e/ou parasitológicos e, na maioria dos casos, persiste indefinidamente (27, 28). Embora a maioria dos pacientes permaneça com a forma indeterminada da doença ao longo da vida, outra parte evolui para uma das formas determinadas com comprometimento visceral da doença (cardíaca, digestiva ou mista) entre 10 e 30 anos após a infecção aguda (29). A progressão da forma indeterminada para a forma cardíaca da doença ocorre em uma taxa em torno de 2% por ano (30, 31). Portanto, mais de

30% dos pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas irão progredir para a forma cardíaca em duas ou três décadas, com alta prevalência de insuficiência cardíaca, distúrbios do ritmo cardíaco, morte súbita e acidente vascular encefálico (26, 28, 32, 33).

A forma cardíaca da doença de Chagas é definida pela presença de um espectro de anormalidades, variando desde alterações eletrocardiográficas incipientes até arritmias ventriculares malignas e cardiomiopatia dilatada com insuficiência cardíaca (34, 35). A doença de Chagas apresenta um espectro pleomórfico de manifestações e pode ser dividida em estágios até a evolução para a insuficiência cardíaca. O estágio A caracteriza o paciente sem doença cardíaca estrutural e sem sintomas de insuficiência cardíaca; no estágio B1, os pacientes são assintomáticos e se apresentam com alterações eletrocardiográficas; discretas alterações de mobilidade segmentar ao ecocardiograma podem estar presentes. No estágio B2, os pacientes apresentam redução da função sistólica ventricular, mas nunca apresentaram sinais ou sintomas de insuficiência cardíaca; o estágio C compreende os pacientes com disfunção sistólica ventricular, além de sinais e sintomas prévios ou atuais de insuficiência cardíaca. No estágio D, os pacientes apresentam sintomas de insuficiência cardíaca ao repouso, refratários à terapia medicamentosa otimizada e com necessidade de intervenções intensivas e especializadas.

A insuficiência cardíaca é, usualmente, uma manifestação tardia da doença, caracterizada por sinais de congestão sistêmica e pulmonar (36). A redução da função sistólica global do ventrículo esquerdo é um forte preditor de desfechos desfavoráveis (25), assim como a disfunção do ventrículo direito está associada a um pior prognóstico nos estágios avançados da doença (37).

Considerando o prognóstico de pacientes com a fase crônica da doença de Chagas, vários marcadores de risco foram identificados, sendo que os seguintes foram associados com pior prognóstico na cardiomiopatia chagásica crônica: comprometimento da função sistólica do ventrículo esquerdo, classe funcional III/IV (NYHA), cardiomegalia, taquicardia ventricular não sustentada (36). Tais fatores prognósticos têm sido usados para compor escores de risco de morte, os quais são úteis para o seguimento do paciente, assim como ferramenta de auxílio para a definição de decisões clínicas. Assim, várias foram as tentativas científicas de definir um grupo de pacientes com CCC que está sob maior risco de óbito e complicações cardiovasculares. Dentre elas, o escore de Rassi, desenvolvido em tal grupo de pacientes e baseado em dados clínicos, radiológicos, ecocardiográficos e monitorização por

Holter, foi capaz de classificar os pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas em três grupos de risco: baixo, intermediário e alto. A sobrevida em 10 anos dos indivíduos de baixo risco é de 90%, em comparação com uma sobrevida de apenas 16% nos pacientes de alto risco (38).

Considerando-se seu caráter ainda endêmico em uma extensa área geográfica e sua alta morbidade e mortalidade como descritas acima, associado à imprevisibilidade e longa duração de sua evolução para a forma cardíaca, torna-se premente a disponibilidade de exames diagnósticos capazes de detectar e acompanhar alterações precoces de estrutura e função cardíaca.

A ecocardiografia é uma modalidade de diagnóstico por imagem não invasiva, amplamente disponível e de baixo custo, capaz de oferecer informações importantes a respeito da estrutura e função cardíacas em diversos cenários clínicos (39). Em pacientes com doença de Chagas, o uso deste método de imagem com suas técnicas convencionais (modo M, imagem bidimensional, análise de fluxo por Doppler espectral e mapeamento a cores) possibilita a identificação de diversas alterações (40). Nos estágios menos avançados de envolvimento cardíaco na doença de Chagas, a ecocardiografia pode demonstrar anormalidades de contratilidade segmentar do ventrículo esquerdo e sinais de disfunção diastólica (41-43). As regiões do ventrículo esquerdo mais comumente acometidas são os segmentos apicais e os segmentos das paredes inferior e ínfero-lateral, na ausência de lesões coronarianas obstrutivas (44). As alterações de mobilidade segmentar, quando presentes, identificam os pacientes em risco de futura deterioração da função sistólica global do ventrículo esquerdo (45).

Diversos estudos identificaram o poder de variáveis ecocardiográficas como preditoras de mortalidade na CCC(41), especialmente a baixa fração de ejeção do ventrículo esquerdo obtida pela ecocardiografia bidimensional (36, 38, 44, 46, 47). Subsequentemente, parâmetros ecocardiográficos destinados à avaliação das pressões de enchimento do ventrículo esquerdo foram reportados como dados adicionais para estratificação de risco em pacientes com disfunção sistólica do ventrículo esquerdo também neste grupo de pacientes (47).

Considerando-se que o dano miocárdico é um processo contínuo, cuja disfunção sistólica está posicionada na sua fase final evolutiva, o interesse em estudar a função cardíaca antes que ocorra disfunção sistólica, também é comum a diversos cenários clínicos. Técnicas ecocardiográficas mais recentes como o estudo da função diastólica do ventrículo esquerdo

através do movimento longitudinal do anel mitral pelo Doppler tecidual foram aplicadas em pacientes com doença de Chagas. A avaliação da função diastólica do ventrículo esquerdo, utilizando a razão entre a velocidade da onda inicial de fluxo transmitral (onda E) e a velocidade diastólica obtida pelo Doppler tecidual do anel mitral (onda e'), é aceita como um método não invasivo com o fim de estimar as pressões de enchimento do ventrículo esquerdo e se demonstrou um preditor independente de mortalidade em pacientes com CCC em vários estudos (41, 46-48). Foi observado, também, que a relação E/e' incrementou a capacidade de predição de risco de um modelo que utilizou parâmetros como classe funcional, fração de ejeção do ventrículo esquerdo e parâmetros de função sistólica do ventrículo direito (47).

Outro parâmetro ecocardiográfico que também reflete a disfunção diastólica do ventrículo esquerdo é o aumento do volume atrial esquerdo e este também já foi estudado na CCC e se mostrou preditor independente de mortalidade, adicionando valores prognósticos aos clássicos parâmetros clínicos, fração de ejeção e parâmetros de função diastólica derivados do Doppler (49). Logo, usando a Ecocardiografia, é possível detectar sinais de dano cardíaco antes da queda da fração de ejeção do ventrículo esquerdo e estes sinais são potenciais marcadores prognósticos.

Assim, há ainda grande expectativa científica em relação à identificação de índices ecocardiográficos capazes de identificar lesão cardíaca precoce em pacientes que estão em risco de desenvolver a CCC, ou seja, uma porcentagem de todos aqueles infectados que ainda não manifestaram nenhuma forma de comprometimento orgânico da doença, estando na forma indeterminada (50). Identificar a evolução do dano miocárdico é ainda o primeiro passo para a progressão da linha de conhecimento ao ponto de se testar terapias específicas para pacientes ainda na forma indeterminada da doença, período no qual a fibrose e outros processos irreversíveis ainda não se instalaram.

1.4. Avaliação da deformação miocárdica do ventrículo esquerdo

A avaliação da função sistólica do ventrículo esquerdo deve ser feita utilizando diversos parâmetros e interpretada à luz do contexto clínico (51). A fração de ejeção do ventrículo esquerdo avalia a variação de volume sanguíneo que ocorre durante o ciclo cardíaco. Contudo, essa variação compreende apenas o produto final de diversas outras alterações na mecânica cardíaca que ocorrem em âmbito celular (51, 52). Durante a sístole, o encurtamento das fibras do endocárdio e epicárdio (dispostas no sentido longitudinal) levam à redução do comprimento longitudinal do coração (sentido base-ápice). Já o encurtamento das fibras

mesocárdicas (dispostas no sentido circunferencial) leva, por sua vez, ao espessamento do coração no sentido radial (centrípeto). Assim, algumas patologias em estágios iniciais podem cursar com redução da função daquelas fibras dispostas longitudinalmente, mas com aumento compensatório da função das fibras dispostas circunferencialmente, fazendo com que a fração de ejeção do ventrículo esquerdo permaneça inalterada mesmo na presença de disfunção miocárdica incipiente (52-57).

Já a detecção de anormalidades na mobilidade segmentar do ventrículo esquerdo por técnicas ecocardiográficas convencionais é realizada por avaliações subjetivas e visuais, dependendo das habilidades do operador e alterações sutis, mesmo de espessamento radial de mobilidade miocárdica, podem não ser percebidas por meio da análise visual. Além disto, visualmente, é impossível identificar espessamentos miocárdicos em seus diferentes eixos, nem ao menos quantificá-los. Para transpor esta limitação, na última década, foi desenvolvida uma técnica ecocardiográfica de mensuração da deformação miocárdica através da identificação e rastreamento de pontos da imagem bidimensional ecocardiográfica. Esta técnica recebeu a nomenclatura em inglês de *speckle tracking echocardiography* (STE), técnica esta que permite análises quantitativas, portanto, mais precisas da função miocárdica, adicionando valor às medidas ecocardiográficas convencionais (58, 59). Uma das formas de se caracterizar as variações na mecânica cardíaca é pela análise da deformação miocárdica (*strain*), que pode ser estudada em seus sentidos longitudinal, radial e circunferencial (Figura 2).

Figura 2 - Representação da deformação do ventrículo esquerdo nos eixos radial, circunferencial e longitudinal (da esquerda para a direita).

O estudo da deformação miocárdica surgiu nos últimos anos como um método promissor para a análise da função cardíaca por possibilitar a detecção precoce de alterações incipientes da função miocárdica segmentar e global. A análise da deformação miocárdica pela STE baseia-se no rastreamento (*tracking*) de marcadores acústicos naturais, que são padrões de pontos de brilho presentes na imagem bidimensional em escala de cinza, também chamados de *speckles*. Os *speckles* funcionam como uma impressão digital do determinado segmento miocárdico avaliado, sendo possível calcular a deformação do tecido e a velocidade com que essa deformação ocorre, a partir do deslocamento de tais marcadores (60).

Sabe-se que o *strain* global do ventrículo esquerdo está precocemente reduzido em doenças que cursam com hipertrofia do cardiomiócito e/ou com desarranjo da matriz extracelular como, por exemplo, na cardiopatia hipertensiva, cardiomiopatia hipertrófica, diabetes, na cardiotoxicidade induzida por quimioterápicos, a despeito de uma fração de ejeção do ventrículo esquerdo normal (58, 61-63). Portanto, STE é uma técnica que possibilita a mensuração da deformação miocárdica e é utilizada de forma não invasiva com o objetivo de quantificar a função segmentar e global ventricular (64).

1.5. O ventrículo direito na doença de Chagas

A doença de Chagas humana parece envolver o ventrículo direito de uma forma peculiar. Primeiro, na evolução da doença até os estágios em que a insuficiência cardíaca esteja presente, frequentemente há sinais de insuficiência cardíaca direita, com importante congestão sistêmica, na ausência de sinais de congestão pulmonar (25). Segundo, porque há evidências de lesão miocárdica direta no ventrículo direito de humanos em biópsias endomiocárdicas e em estudos pós-morte (19, 65), assim como em modelos experimentais animais; terceiro, existe um percentual de pacientes com acometimento precoce do ventrículo direito ou mesmo envolvimento isolado dessa câmara segundo avaliação por diferentes métodos de imagem cardíaca (66). Por fim, há dados demonstrando pior prognóstico quando existe disfunção sistólica do ventrículo direito (37).

O dano miocárdico na doença de Chagas tipicamente causa distúrbios de contração segmentar do ventrículo esquerdo, além de dilatação e disfunção sistólica global do ventrículo esquerdo, frequentemente observadas com a progressão da doença (67, 68). O dano direto ao miocárdio do ventrículo direito também pode ocorrer, contribuindo para a disfunção sistólica do ventrículo direito (37, 69, 70), disfunção esta que pode ser agravada pela sobrecarga pressórica e hipertensão pulmonar secundárias ao comprometimento sistólico e diastólico do

ventrículo esquerdo. O envolvimento do ventrículo direito poderia explicar alguns casos de pacientes que são admitidos nas unidades de emergência com preponderância de sinais e sintomas de congestão sistêmica (ganho de peso, edema de membros inferiores, ascite e dor abdominal por hepatomegalia). A insuficiência cardíaca direita é uma forma de apresentação clínica cujo tratamento continua sendo um desafio, com pacientes necessitando de altas doses de diuréticos, vasodilatadores e, muitas vezes, inotrópicos endovenosos (32).

Métodos de imagem têm sido empregados para a avaliação morfológica e funcional do ventrículo direito. Parâmetros ecocardiográficos tais como: índice de performance miocárdica; *tricuspid annular plane systolic excursion* (TAPSE) (71, 72); velocidade da onda sistólica da porção lateral do anel tricuspídeo obtida pelo Doppler tecidual (onda S'); mudança fracional da área do ventrículo direito e avaliação da deformação miocárdica pela técnica de rastreamento de pontos (37).

A ressonância nuclear magnética, por exemplo, é outro exame que tem sido utilizado para a avaliação do ventrículo direito. Existem evidências demonstrando que a disfunção sistólica do ventrículo direito detectada pela ressonância está mais comumente associada com a presença de disfunção sistólica e redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, sendo que a disfunção isolada do ventrículo direito é incomum, identificada em apenas 4,4% dos pacientes (73).

1.6. Modelo experimental animal da doença de Chagas

Um aspecto saliente a respeito da execução de estudos longitudinais visando demonstrar a evolução do dano miocárdico na doença de Chagas e, também, o impacto do diagnóstico precoce de lesões incipientes é o tempo de observação extremamente longo (duas a três décadas) necessário para observar a progressão da doença a partir da fase aguda. Esse virtual impedimento à condução de um estudo desta natureza em humanos reforça as vantagens de se investigar tais hipóteses em modelos experimentais animais adequados.

Neste contexto, o modelo de infecção pelo *T. cruzi* no hamster sírio tem-se mostrado bastante adequado em mimetizar a evolução natural da doença de Chagas humana (74, 75). No estudo de Bilate em 2003, a infecção de hamsters sírios fêmeas com $3,5 \times 10^4$ ou 10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y produziu graus variáveis de disfunção ventricular e miocardite difusa ou multifocal na quase totalidade dos animais investigados entre 8 e 12 meses, após um período latente sem anormalidades significantes (fase

indeterminada). O mesmo modelo foi também objeto de outros estudos, demonstrando que a CCC produzida neste modelo se assemelha de forma muito próxima àquela encontrada em humanos, sendo observado progressão da doença até fases mais tardias, que cursam com disfunção sistólica e dilatação importantes do ventrículo esquerdo em um tempo inferior a um ano após a inoculação do parasita (76, 77). Oliveira e colaboradores observaram mortalidade geral de 43% no modelo animal de hamsters sírios com infecção pelo *T. cruzi*, sendo 33% de mortalidade na fase aguda e 10% na fase crônica (78).

Outros modelos de doença de Chagas em animais são descritos na literatura, como camundongos (11, 79, 80) ratos (81). No entanto, algumas particularidades da forma de desenvolvimento da cardiopatia nesses modelos não reproduzem a evolução natural da doença de Chagas em humanos. No modelo que utilizou camundongos, esses animais desenvolveram uma fase aguda bastante intensa, com elevada mortalidade. Os sobreviventes evoluíram diretamente para uma forma determinada orgânica, sem passar por uma fase de quiescência da doença, que caracterizaria o equivalente a uma fase crônica em forma indeterminada (75, 82, 83). Por outro lado, estudos demonstram que os ratos podem ser altamente resistentes à infecção pelo *T. cruzi*, ocorrendo, na maioria dos casos, a interrupção da infecção de forma imprevisível sem o desenvolvimento tardio da forma cardíaca da doença (81).

1.7. Justificativa

A doença de Chagas humana é uma doença infecciosa que pode acometer, dentre outros órgãos, o coração. Vários estudos clínicos e experimentais animais têm mostrado a participação de mecanismos fisiopatológicos complexos que podem produzir lesões miocárdicas, com consequente desenvolvimento tardio de fibrose regional. Os dois mecanismos principais são: agressão miocárdica dependente do parasitismo persistente e de baixa intensidade no tecido cardíaco e lesão miocárdica mediada pelo sistema imune. Em virtude desses aspectos peculiares da cardiomiopatia chagásica, ferramentas diagnósticas capazes de detectar envolvimento cardíaco precoce dos ventrículos podem representar o primeiro passo em direção ao tratamento precoce dos pacientes, bem antes do desenvolvimento de extensas áreas de fibrose e outras alterações irreversíveis.

A STE é uma ferramenta da ecocardiografia bidimensional relativamente recente na prática clínica e discussões sobre suas vantagens metodológicas em relação a outras técnicas são de grande interesse (84). Com essa ferramenta, a função sistólica ventricular pode ser avaliada ao longo de todo o miocárdio por meio da análise da deformação miocárdica, a qual

é relativamente independente das condições de carga (85, 86). Assim, em teoria, a técnica ecocardiográfica de rastreamento de pontos poderia ser aplicada para detectar dano ao músculo cardíaco mesmo quando mecanismos fisiológicos compensatórios sejam recrutados com o fim de manter a fração de ejeção ventricular ainda dentro dos limites considerados normais (85). Dessa forma, considerando que padrões de infiltrado inflamatório crônico podem estar presentes no coração de pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas, alterações da deformação miocárdica potencialmente coexistentes poderiam ser detectadas pela STE. Por conseguinte, a análise da deformação miocárdica do ventrículo esquerdo pela STE poderia evidenciar precocemente algum dano contrátil ventricular regional e/ou global de indivíduos até então considerados normais segundo a avaliação de função sistólica pelos clássicos parâmetros da ecocardiografia, como, por exemplo, a fração de ejeção.

De fato, nenhum estudo prévio investigou os padrões de deformação miocárdica pela ecocardiografia em modelos experimentais de infecção pelo *T. cruzi* em hamsters. A detecção de alterações da deformação miocárdica regional e/ou global em estudos de evolução longitudinal com animais poderia fornecer, também, uma oportunidade de investigar possíveis correlações com as alterações histológicas presentes na cardiomiopatia chagásica, contribuindo, assim, para uma maior compreensão dos aspectos fisiopatológicos da doença.

As hipóteses testadas no nosso estudo foram: os parâmetros de deformação miocárdica estão reduzidos precocemente em um modelo animal de doença de Chagas em hamsters sírios, antecipando o diagnóstico de dano miocárdico em comparação às ferramentas diagnósticas ecocardiográficas tradicionais; o ventrículo direito está precocemente acometido em hamsters sírios infectados pelo *T. cruzi*.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo é avaliar as alterações sequenciais de parâmetros estruturais e funcionais dos ventrículos em um grupo experimental de hamsters sírios com doença de Chagas em comparação com um grupo de hamsters controle.

2.2. Objetivos específicos

- Definir o comportamento dos índices de deformação miocárdica do ventrículo esquerdo pela técnica ecocardiográfica de rastreamento de pontos ao longo do tempo no grupo Chagas e comparar com o grupo controle.
- Definir o comportamento de parâmetros ecocardiográficos convencionais de estrutura e função do ventrículo esquerdo entre os grupos experimentais de hamsters sírios ao longo do tempo.
- Avaliar o comportamento da função sistólica do ventrículo direito pelo índice TAPSE ao longo do tempo nos animais com doença de Chagas e comparar com o grupo controle.
- Avaliar a correlação de parâmetros ecocardiográficos convencionais e de deformação miocárdica do ventrículo esquerdo com alterações histopatológicas miocárdicas.

Métodos

3. MÉTODOS

3.1. População de estudo

Foram utilizados hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) - fêmeas adultas de 12 semanas de idade - fornecidos pela Anilab (Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda, Paulínia/SP, Brasil).

Os hamsters foram mantidos em ambiente climatizado no Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), submetidos a ritmo de 12 horas de luz/sombra, com acesso livre à água e ração padrão.

O projeto foi desenvolvido seguindo as recomendações internacionais em experimentação animal (87) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (Anexo A).

Foram definidos como critérios de exclusão do estudo:

- a) Presença de alterações ao ecocardiograma basal, tais como defeitos congênitos, alterações de mobilidade segmentar, etc.
- b) Presença de arritmias persistentes como bigeminismo ou arritmias sustentadas (taquicardia supraventricular sustentada; taquicardia ventricular sustentada) durante o exame ecocardiográfico.
- c) Impossibilidade ou incapacidade de sedação adequada com a dose preconizada dos anestésicos selecionados para o estudo.
- d) Evidências clínicas de patologias extracardíacas ou deformidades da caixa torácica nos animais estudados.

3.2. Protocolo experimental

Os animais do grupo infecção (n= 37) foram inoculados intraperitonealmente com $3,5 \times 10^4$ formas tripomastigotas de *T. cruzi*, cepa Y, enquanto o grupo controle (n= 20) recebeu igual volume de solução salina pela mesma via. Ecocardiograma foi realizado nos seguintes momentos: imediatamente antes da infecção ou administração de solução salina (exame basal) e repetido para avaliação das fases aguda (1 mês pós infecção) e crônica (4, 6 e 8 meses após a infecção). Os momentos para a realização do exame ecocardiográfico, assim como o número de parasitas inoculados, foram escolhidos com o objetivo de se obter animais que estivessem em momentos distintos de agressão miocárdica pela doença (74, 78). Ao final do período de

estudo, os animais foram submetidos à eutanásia e fragmentos do coração foram obtidos e preparados para a análise histológica.

Figura 3- Esquema do delineamento geral do estudo.

3.3. Ecocardiograma

A avaliação ecocardiográfica foi realizada utilizando um sistema de ultrassonografia comercialmente disponível e destinada ao estudo experimental animal: Vevo® 2100 (VisualSonics Inc, Toronto, Canadá) com um transdutor linear de 30 MHz de frequência fundamental dedicado ao estudo de pequenos animais (Figura 4). As imagens foram adquiridas por um único examinador habilitado em ecocardiografia clínica, com pelo menos dois anos de treinamento reconhecidos pelo Departamento de Imagem Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia e com experiência na realização de ecocardiograma em roedores. Os estudos ecocardiográficos foram realizados após sedação dos animais com ketamina/xilazina intramuscular nas doses de 100mg/kg e 10mg/kg respectivamente (88).

Figura 4 - Aparelhos utilizados para a realização do exame ecocardiográfico. (A) Equipamento de ecocardiograma VEVO 2100. (B) Transdutor linear de 30 MHz.

Para execução do exame ecocardiográfico, após a anestesia, foi realizada tricotomia da região anterior do tórax com creme depilatório disponível comercialmente, posicionamento dos animais sobre uma plataforma inclinável com controle de temperatura para evitar hipotermia (VisualSonics Inc, Toronto, Canadá) e monitorização eletrocardiográfica de superfície durante todo o tempo de exame (Figura 5) e com os animais mantidos em ventilação espontânea. Gel aquecido foi aplicado sobre o transdutor, o qual foi cuidadosamente posicionado sobre o tórax do animal, evitando pressão excessiva e, consequentemente, indução de bradicardia.

Figura 5 - Mesa com superfície aquecida, inclinável e com quatro superfícies de metal para monitorização eletrocardiográfica.

As seqüências de vídeos foram adquiridas com pelo menos três ciclos cardíacos nas seguintes projeções: paraesternal longitudinal (PEL) e paraesternal eixo curto (PEC) ao nível

médio ventricular com visualização dos músculos papilares. Foram realizados ajustes em parâmetros como ganho, posição do foco e profundidade para aquisição de imagens de melhor qualidade e a maior quantidade de quadros por segundo possível para cada uma das projeções.

Imagens em modo M e bidimensionais (Figura 6) foram utilizadas para avaliar as medidas convencionais ecocardiográficas de geometria e função ventricular: septo interventricular (SIV), parede posterior do ventrículo esquerdo (PPVE), diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE), diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) pela fórmula de Teichholz (89) nas projeções PEL e PEC. Para o cálculo da FEVE pelo modo bidimensional, foi selecionado o vídeo mais representativo da projeção PEL e com a melhor definição das bordas do endocárdio. Em seguida, era escolhido o quadro com o maior volume diastólico, seguido da marcação das bordas do endocárdio em diástole. No mesmo ciclo cardíaco era selecionado o quadro com menor volume sistólico e realizada a marcação das bordas do endocárdio em sístole.

Figura 6 - Modo M guiado pela imagem bidimensional em eixo longo (A) e eixo curto (B) em hamster. LVID; d- diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (setas brancas); LVID; s- diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (setas amarelas).

O índice TAPSE foi utilizado para avaliar a função sistólica do ventrículo direito. Tais medidas foram realizadas *off-line* em estação de trabalho (VisualSonics Inc, Toronto, Canadá) após seleção daquelas imagens mais representativas do ciclo cardíaco e sem interferências de movimentos respiratórios.

Para a aplicação da técnica de rastreamento de pontos, as imagens foram obtidas e posteriormente analisadas em estação de trabalho comercialmente disponível Vevo® Strain (VisualSonics Inc, Toronto, Canadá) conforme recomendações do fabricante (90). Tal equipamento, dedicado ao estudo experimental animal, permite a avaliação da deformação miocárdica bidimensional pelo método de rastreamento de pontos das camadas endocárdica e epicárdica nas janelas PEL e PEC (Figura 7).

Figura 7 - Representação do ventrículo esquerdo nos cortes paraesternal eixo longo e paraesternal eixo curto em hamsters. As setas em amarelo indicam a deformação radial; as setas em vermelho indicam a deformação longitudinal e as setas em azul indicam a deformação circunferencial.

Para cada projeção foi escolhido o ciclo cardíaco mais representativo, levando-se em consideração: maior taxa de quadros por segundo disponível; ausência de artefatos provocados por movimentos respiratórios do animal; melhor visualização dos segmentos ventriculares. O início da sístole foi definido como o pico da onda R do eletrocardiograma de superfície e o final da sístole definida como o momento de menor dimensão da cavidade ventricular esquerda. Para delimitar as bordas do endocárdio, 8 a 12 pontos de marcação ao longo da cavidade ventricular esquerda foram manualmente distribuídos pelo observador e de forma sequencial. Quando o primeiro quadro não permitia a correta visualização dos segmentos, foi selecionado um quadro subsequente que apresentasse melhor visualização. Para definição da área de análise, o *software* permitia ajuste de um traçado do epicárdio até o endocárdio, delimitando, portanto, a espessura do miocárdio e evitando atingir o sinal mais refringente representativo do pericárdio. A análise da deformação miocárdica foi executada em *software* específico e o traçado gerado pelo programa. A qualidade do rastreamento de pontos foi monitorada pelo avaliador. Após otimização do traçado, foram obtidos os valores de deformação sistólica de pico para cada um dos segmentos e para cada uma das projeções

nas camadas endocárdica e epicárdica. O *strain* longitudinal global (GLS) foi medido na projeção paraesternal eixo longo (incluindo o ápice), enquanto o *strain* circunferencial global (GCS) e o *strain* radial global (GRS) foram medidos na projeção paraesternal eixo curto - nível médio da cavidade (Figuras 8 e 9). Todos os valores de deformação miocárdica (*strain*) medidos eram fornecidos automaticamente pelo *software* como valores de deformação endocárdica de pico sistólico, ou seja, os menores valores observados ao longo do período sistólico de cada curva.

Figura 8 - Análise da deformação endocárdica global e segmentar na janela paraesternal eixo longo. (A) Deformação radial. (B) Curvas da deformação radial. (C) Deformação longitudinal. (D) Curvas da deformação longitudinal. São representados os valores de deformação endocárdica global e para cada um dos segmentos do ventrículo esquerdo.

Figura 9 - Análise da deformação endocárdica global e segmentar na janela paraesternal eixo curto. (A) Deformação radial. (B) Curvas da deformação radial. (C) Deformação circunferencial. (D) Curvas da deformação circunferencial. São representados os valores de deformação endocárdica global e para cada um dos segmentos do ventrículo esquerdo.

3.4. Análise histológica

Após anestesia profunda, o tórax foi aberto e os animais foram sacrificados. Rapidamente o coração foi retirado e lavado em solução tampão isotônica fosfato-salino. Em seguida, os vasos da base e os átrios foram descartados.

Para análise histopatológica, foram obtidos cortes perpendiculares ao longo eixo cardíaco, em três níveis do coração (basal, médio-ventricular e apical), com o cuidado de se manter a posição dos cortes de forma a permitir a correlação topográfica com as imagens *in vivo*. Os cortes adequadamente posicionados foram fixados em solução de formaldeído a 10%, por 24 horas, e depois transferidas para álcool 70%. As amostras foram progressivamente desidratadas, embebidas em parafina, cortadas e coradas com hematoxilina-eosina para quantificação das células inflamatórias. A quantidade de células inflamatórias foi determinada por meio da contagem do número de células intersticiais mononucleares arredondadas (foram excluídas as células intersticiais com formato alongado, semelhante aos

fibroblastos), sem diferenciação entre o tipo celular. Foram selecionados 5 campos distribuídos aleatoriamente por toda a parede livre do ventrículo esquerdo. O aumento utilizado foi 400x e o resultado expresso em número de células inflamatórias por campo.

3.5. Análise estatística

A distribuição das variáveis foi avaliada por meio de histogramas e testada quanto ao padrão de normalidade pelo método de Shapiro-Wilk. As variáveis contínuas foram apresentadas como média $\pm$ desvio-padrão, se distribuição normal ou como mediana (intervalo interquartil) se distribuição não normal. Para as análises de correlação, foram aplicados os testes de Pearson (para variáveis normalmente distribuídas) e Spearman (para variáveis não distribuídas como uma curva normal).

O desenho experimental apresenta como variáveis dependentes os parâmetros ecocardiográficos de avaliação estrutural e funcional dos ventrículos esquerdo e direito. Cada um desses parâmetros foi analisado separadamente, obtendo-se medidas repetidas ao longo do tempo, consistindo de uma avaliação inicial e reavaliações após 1 mês, 4 meses, 6 meses e 8 meses. Os animais foram divididos em dois grupos: infectados pelo *T. cruzi* (grupo Chagas) e não infectados pelo *T. cruzi* (controles). Assim, trata-se de um modelo de efeitos mistos (*mixed effect models*), resultante da interação (*main effect*) de duas variáveis independentes: tempo e infecção pelo *T. cruzi*. O fator tempo associa-se a efeitos e potenciais diferenças em um mesmo indivíduo (*within-subjects effects*), enquanto a infecção pelo *T. cruzi*, avaliada como variável categórica binária (infecção presente ou ausente), associa-se a efeitos e potenciais diferenças entre os indivíduos (*between-subjects effects*). Dessa forma, a avaliação das diferenças entre os dois grupos de animais ao longo de tempo foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) para modelos mistos de medidas repetidas em um dos fatores (*mixed ANOVA* ou *split-plot factorial ANOVA*). O objetivo primário foi avaliar se há interação significativa entre esses fatores sobre as variáveis dependentes. Apenas os animais que estavam vivos ao final do seguimento, com medidas ecocardiográficas em todos os períodos de tempo avaliados, foram incluídos na análise.

Os dados foram analisados com o programa Stata versão 14.2 (StataCorp, TX, USA). Estabeleceu-se como nível de significância um valor $p < 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Número de animais estudados

Um total de 62 hamsters sírios foi incluído no estudo. Um animal foi excluído pela evidência de patologia extracardíaca (deformidade da caixa torácica), dois animais foram excluídos pela presença de arritmias (bigeminismo persistente e taquicardia ventricular sustentada) na avaliação basal. Além disso, dois animais foram a óbito na primeira indução anestésica, antes do início do ecocardiograma, totalizando 57 roedores nos quais a ecocardiografia basal foi realizada. A partir deste número de animais, dois grupos foram criados randomicamente: um grupo controle com 20 animais e um grupo infecção (grupo Chagas) com 37 animais. O número de animais respeitou a premissa delineada no projeto deste estudo de que um mínimo de 20 animais em cada grupo seria necessário para demonstrar diferenças significativas nos parâmetros ecocardiográficos de função ventricular esquerda com adequado poder estatístico, levando-se em consideração, ainda, uma mortalidade prevista de 50% neste modelo experimental animal.

4.2. Características da população de estudo

Ao exame basal, os dois grupos apresentaram idade média de 89 ± 1 dias. Os animais do grupo controle apresentaram peso de 130 ± 15 gramas; frequência cardíaca de 204 ± 18 batimentos/minuto, enquanto que aqueles do grupo Chagas apresentaram peso de 143 ± 12 gramas e frequência cardíaca de 198 ± 18 batimentos/minuto. Os valores de peso foram significativamente diferentes ($p= 0,004$) entre os grupos, mas não os de frequência cardíaca. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação aos parâmetros morfológicos e funcionais ecocardiográficos, tanto do ventrículo esquerdo, quanto do ventrículo direito. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi de $64 \pm 5 \%$ no grupo controle e de $61 \pm 5 \%$ no grupo Chagas, $p= 0,10$, enquanto o GLS foi de $-15,2 \pm 2,7 \%$ no grupo controle e de $-14,2 \pm 3,4 \%$ no grupo Chagas, $p= 0,25$ (Tabela 1).

Tabela 1 - Características demográficas, clínicas e ecocardiográficas basais.

	Grupo Chagas	Grupo controle	Valor-p
	n=37	n=20	
Idade (dias)	89 ± 1	89 ± 1	0,551
Peso (gramas)	143 ± 12	130 ± 15	0,004
Frequência cardíaca (bpm)	198 ± 18	204 ± 18	0,277
Diâmetro diastólico final do VE (mm)	6,6 ± 0,3	6,6 ± 0,3	0,575
Diâmetro sistólico final do VE (mm)	4,4 ± 0,4	4,3 ± 0,4	0,503
Fração de ejeção do VE (%)	61 ± 5	64 ± 5	0,101
TAPSE (mm)	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2	0,810
<i>Strain</i> longitudinal (GLS) (%)	-14,2 ± 3,4	-15,2 ± 2,7	0,256
<i>Strain</i> circunferencial (GCS) (%)	-20,4 ± 2,8	-20,0 ± 2,2	0,550
<i>Strain</i> radial (GRS) (%)	32,6 ± 9,5	33,7 ± 10,4	0,878

4.3. Avaliação sequencial dos parâmetros ecocardiográficos

Os dados evolutivos ao longo dos tempos do estudo, relacionados à estrutura e função dos ventrículos estão expressos na tabela 2 (grupo controle) e na tabela 3 (grupo Chagas).

Tabela 2 - Avaliação sequencial de estrutura e função dos ventrículos no grupo controle.

Grupo controle	1	2	3	4	5
	Basal	1 mês	4 meses	6 meses	8 meses
DDFVE (mm)	6,6 ± 0,3	6,8 ± 0,3	7,2 ± 0,3	7,4 ± 0,3	7,6 ± 0,5
DSFVE (mm)	4,3 ± 0,4	4,4 ± 0,3	4,7 ± 0,3	4,8 ± 0,4	4,9 ± 0,5
FEVE (%)	63 ± 5	63 ± 3	61 ± 4	62 ± 5	62 ± 5
GLS (%)	-15,2 ± 2,6	-15,4 ± 2,4	-16,3 ± 2,9	-19,3 ± 2,4	-15,0 ± 2,0
GCS (%)	-20,0 ± 2,2	-19,0 ± 2,1	-19,0 ± 2,0	-16,0 ± 2,6	-18,0 ± 3,0
GRS (%)	34,0 ± 10,0	31,0 ± 4,5	29,0 ± 6,0	30,0 ± 5,6	29,0 ± 9,3
TAPSE (mm)	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,2

DDFVE= diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; DSFVE= diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo; FEVE= fração de ejeção do ventrículo esquerdo; GLS= *strain* longitudinal global; GCS= *strain* circunferencial global; GRS= *strain* radial global; TAPSE= *tricuspid annular plane systolic excursion*.

Tabela 3 - Avaliação sequencial de estrutura e função dos ventrículos no grupo Chagas.

Grupo Chagas	1	2	3	4	5
	Basal	1 mês	4 meses	6 meses	8 meses
DDFVE (mm)	6,6 ± 0,3	6,7 ± 0,6	7,2 ± 0,4	7,5 ± 0,5	8,0 ± 0,6
DSFVE (mm)	4,4 ± 0,4	4,4 ± 0,5	4,8 ± 0,5	5,3 ± 0,7	6,0 ± 1,2
FEVE (%)	61 ± 5	62 ± 7	59 ± 6	55 ± 9	49 ± 14
GLS (%)	-14,2 ± 3,4	-10,4 ± 3,0	-11,3 ± 2,4	-12,7 ± 2,8	-11,1 ± 3,5
GCS (%)	-20,6 ± 2,6	-14,7 ± 3,2	-16,0 ± 3,0	-15,9 ± 2,6	-14,0 ± 4,3
GRS (%)	32,6 ± 9,5	24,6 ± 7,5	23,8 ± 6,5	24,0 ± 6,9	22,7 ± 8,8
TAPSE (mm)	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2

DDFVE= diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; DSFVE= diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo; FEVE= fração de ejeção do ventrículo esquerdo; GLS= *strain* longitudinal global; GCS= *strain* circunferencial global; GRS= *strain* radial global; TAPSE= *tricuspid annular plane systolic excursion*.

A evolução temporal dos parâmetros ecocardiográficos estudados em cada grupo está apresentada como média e intervalo de predição de 95% nas figuras 10 a 16. Os períodos de tempo 1 a 5 representam as avaliações ecocardiográficas realizadas: (1) basal, (2) após 1 mês, (3) após 4 meses, (4) após 6 meses e (5) após 8 meses.

Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE):

Houve aumento progressivo do DDFVE nos dois grupos estudados (Figura 10), mas não houve diferença significativa entre os grupos ao longo do período estudado (valor-p da interação grupos#tempo= 0,158).

Figura 10 - Medidas sequenciais do DDFVE de dois grupos de hamsters ao longo do tempo. Círculos preenchidos representam as médias do DDFVE, enquanto as barras representam os intervalos de predição de 95% para essa variável. DDFVE= diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo.

Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE):

O grupo Chagas apresentou aumento do DSFVE significativamente maior do que o aumento do DSFVE mostrado pelo grupo controle (valor-p da interação grupos#tempo= 0,007). A diferença entre os grupos é verificada após 8 meses do exame basal (Figura 11).

Figura 11 - Medidas sequenciais do DSFVE de dois grupos de hamsters ao longo do tempo. Círculos preenchidos representam as médias do DSFVE, enquanto as barras representam os intervalos de predição de 95% para essa variável. DSFVE= diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo.

Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE):

A FEVE mostrou queda progressiva ao longo do tempo no grupo Chagas, significativamente diferente do padrão apresentado pelo grupo controle (valor-p da interação grupos#tempo= 0,005). A diferença entre os grupos é verificada a partir de 6 meses do exame basal (Figura 12).

Figura 12 - Medidas sequenciais da FEVE de dois grupos de hamsters ao longo do tempo. Círculos preenchidos representam as médias da FEVE, enquanto as barras representam os intervalos de predição de 95% para essa variável. FEVE= fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

Strain longitudinal global (GLS) do ventrículo esquerdo:

O GLS do ventrículo esquerdo do grupo Chagas apresentou comportamento significativamente diferente ao longo do tempo em comparação com o grupo controle (valor-p da interação grupos#tempo= 0,003). A diferença entre os grupos é verificada a partir do primeiro mês após a infecção pelo *T. cruzi*, momento em que se detecta queda pronunciada do GLS do ventrículo esquerdo no grupo Chagas (Figura 13).

Figura 13- Medidas sequenciais do GLS do ventrículo esquerdo de dois grupos de hamsters ao longo do tempo. Círculos preenchidos representam as médias do GLS, enquanto as barras representam os intervalos de predição de 95% para essa variável. Os valores de *strain* foram expressos em forma de número absoluto. GLS= *strain* longitudinal global.

Strain circunferencial global (GCS) do ventrículo esquerdo:

O GCS do ventrículo esquerdo do grupo Chagas apresentou comportamento significativamente diferente ao longo do tempo em comparação com o grupo controle (valor-p da interação grupos#tempo < 0,001). A diferença entre os grupos é verificada a partir do primeiro mês após a infecção pelo *T. cruzi*, momento em que se detecta queda pronunciada do GCS do ventrículo esquerdo no grupo Chagas (Figura 14).

Figura 14- Medidas sequenciais do GCS do ventrículo esquerdo de dois grupos de hamsters ao longo do tempo. Círculos preenchidos representam as médias do GCS, enquanto as barras representam os intervalos de predição de 95% para essa variável. Os valores de *strain* foram expressos em forma de número absoluto. GCS= *strain* circunferencial global.

Strain radial global (GRS) do ventrículo esquerdo:

Não houve diferença significativa (Figura 15) do comportamento do GRS do ventrículo esquerdo entre os grupos estudados (valor-p da interação grupos#tempo= 0,541).

Figura 15- Medidas sequenciais do GRS do ventrículo esquerdo de dois grupos de hamsters ao longo do tempo. Círculos preenchidos representam as médias do GRS, enquanto as barras representam os intervalos de predição de 95% para essa variável. Os valores de *strain* foram expressos em forma de número absoluto. GRS= *strain* radial global.

Índice TAPSE:

O índice de função sistólica de ventrículo direito, TAPSE, do grupo Chagas apresentou comportamento significativamente diferente ao longo do tempo em comparação ao grupo controle (valor-p da interação grupos#tempo < 0,009). A diferença entre os grupos é verificada a partir do primeiro mês de infecção pelo *T. cruzi*, momento em que se detecta queda pronunciada do índice TAPSE no grupo Chagas (Figura 16).

Figura 16 - Medidas sequenciais do TAPSE de dois grupos de hamsters ao longo do tempo. Círculos preenchidos representam as médias do TAPSE, enquanto as barras representam os intervalos de predição de 95% para essa variável. TAPSE= *tricuspid annular plane systolic excursion*.

4.4. Correlação dos índices de geometria e função sistólica de ventrículo esquerdo com alterações histológicas miocárdicas.

O DDFVE não mostrou correlação significativa com o número de células inflamatórias no ventrículo esquerdo ($r= 0,28$; $p= 0,18$). Já o DSFVE e a FEVE mostraram correlação significativa com a quantidade de células inflamatórias. O GLS também mostrou correlação significativa com o número de células inflamatórias presentes no ventrículo esquerdo (Tabela 4).

Tabela 4 - Correlação entre inflamação e parâmetros ecocardiográficos.

Parâmetros ecocardiográficos	Coeficiente de Correlação (r)	Valor p
DDFVE	0,28	0,187
DSFVE	0,41	0,046
FEVE	-0,42	0,042
GLS	0,41	0,047
GCS	0,12	0,574
GRS	-0,22	0,301
TAPSE	-0,39	0,070

DDFVE= diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; DSFVE= diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo; FEVE= fração de ejeção do ventrículo esquerdo; GLS= *strain* longitudinal global; GCS= *strain* circunferencial global; GRS= *strain* radial global; TAPSE= *tricuspid annular plane systolic excursion*.

Discussão

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o comportamento de parâmetros estruturais e funcionais dos ventrículos em um modelo experimental animal de doença de Chagas em hamsters sírios ao longo tempo. Os achados revelam que os novos parâmetros de deformação miocárdica longitudinal e circunferencial obtidos pela técnica ecocardiográfica de rastreamento de pontos mostram-se precocemente alterados nos hamsters sírios infectados com o *T. cruzi*. Em contraste, os parâmetros ecocardiográficos tradicionais de avaliação estrutural e funcional do ventrículo esquerdo, especificamente o DSFVE e a FEVE, embora também demonstrem alteração ao longo da evolução da doença de Chagas, estas só se manifestam nos estágios mais avançados da doença no modelo avaliado. Além disso, a presente investigação indica o precoce acometimento do ventrículo direito nos animais infectados pelo *T. cruzi*, corroborando achados prévios de modelos experimentais e estudos clínicos de comprometimento dessa câmara em estágios iniciais da doença de Chagas, evidenciado por diferentes métodos de imagem (66, 73, 91, 92).

Nosso estudo é o primeiro a aplicar a técnica ecocardiográfica de rastreamento de pontos (*speckle tracking*) em hamsters sírios infectados com *T. cruzi*. Nossos resultados demonstram que, dentre os parâmetros de avaliação funcional do ventrículo esquerdo, a deformação miocárdica longitudinal e a deformação miocárdica circunferencial obtidas pela técnica de rastreamento de pontos são capazes de detectar precocemente dano miocárdico nos animais infectados com o *T. cruzi*, quando comparados com animais controles de mesma idade. Ressalta-se que a alteração desses parâmetros já acontece tão precoce quanto um mês pós-infecção, momento classicamente reconhecido neste modelo como a fase aguda da doença. Existem poucos estudos clínicos que avaliaram a deformação miocárdica do ventrículo esquerdo em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas (93-95). Em um estudo clínico conduzido por Barbosa e colaboradores, que incluiu um número significativo de indivíduos com a forma indeterminada da doença de Chagas, os investigadores encontraram redução da deformação longitudinal regional nos segmentos inferior basal e da parede ínfero-septal do ventrículo esquerdo daqueles indivíduos, em comparação com indivíduos saudáveis de um grupo controle (95). Por outro lado, em outro estudo clínico, os investigadores não encontraram diferenças significativas nos parâmetros de deformação miocárdica de pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas em comparação com controles saudáveis (93). Nossos resultados, portanto, justificam a realização

de mais estudos clínicos que possam avaliar a sensibilidade dos índices de deformação miocárdica como o GLS e o GCS em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas de maneira seriada e, até mesmo, em pacientes na fase aguda da doença. Estratégias que ofereçam métodos diagnósticos de dano miocárdico em estágios iniciais da doença de Chagas são necessárias e podem representar o primeiro passo na seleção de pacientes que possam se beneficiar de tratamentos precoces, uma vez que nenhum estudo tenha sido capaz de mostrar benefícios do tratamento etiológico de pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas, mesmo com FEVE ainda dentro de limites considerados normais (96, 97).

Nossos resultados demonstram que a deformação radial do ventrículo esquerdo não é um parâmetro capaz de diagnosticar precocemente lesão miocárdica nos animais infectados com *T. cruzi*. Esse fato pode estar relacionado à natureza intrínseca da aferição de tal parâmetro. Sabe-se que, durante a sístole, a deformação longitudinal e a deformação circunferencial são seguidas por espessamento radial, provocando grandes variabilidades inter e intra-observadores do GRS já observadas em estudos clínicos e experimentais animais prévios (98). Em concordância com nossos achados, Lima e colaboradores não observaram diferenças do GRS de pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas em comparação com pacientes controles (94).

As medidas de deformação miocárdica do ventrículo esquerdo foram cuidadosamente obtidas no nosso estudo, seguindo os princípios das recomendações atuais que padronizaram tais medidas (84). Na presente avaliação, tivemos preocupação em manter adequada monitorização eletrocardiográfica dos animais para definição precisa da sístole e, consequentemente, obtenção dos valores de deformação miocárdica de pico sistólico. Definições dos tempos para as medidas dos valores de pico de deformação miocárdica nem sempre foram feitas em investigações no cenário da doença de Chagas. Considerando a grande quantidade de distúrbios de condução eletrocardiográficos em pacientes com doença de Chagas, as medidas pós-sistólicas de deformação miocárdica podem não representar corretamente a função sistólica de tais pacientes, podendo, até mesmo, ser similares às medidas obtidas em indivíduos controles. No estudo conduzido por Gomes e colaboradores, não houve definição dos tempos de marcação sistólica, podendo justificar a ausência de diferenças significativas nos parâmetros de deformação miocárdica entre os pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas e indivíduos controles (93). De forma semelhante, outro estudo que incluiu 32 pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas não

descreveu o tempo de marcação do pico da deformação miocárdica, não encontrando diferenças significativas dos índices de deformação miocárdica entre os grupos (99).

O presente estudo mostra que clássicos parâmetros de avaliação estrutural e funcional do ventrículo esquerdo, especificamente o DSFVE e a FEVE, mostram-se alterados apenas em estágios tardios da evolução da doença de Chagas, corroborando achados prévios de estudos clínicos e, também, estudos experimentais que utilizaram o mesmo modelo (23, 36, 40, 44, 74, 100). O aumento do diâmetro sistólico e redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo representam um estágio avançado da CCC. No nosso estudo, o DSFVE e a FEVE estão alterados nos hamsters seis meses após a infecção pelo *T. cruzi*, em comparação aos animais do grupo controle. Estudos prévios na literatura, utilizando o mesmo modelo animal, encontraram diferenças tardias em tais parâmetros ecocardiográficos, alterações estas que foram observadas apenas em avaliações em torno de oito meses após a infecção, com os parâmetros tradicionais ecocardiográficos dos animais com doença de Chagas comparáveis aos parâmetros dos animais controles na avaliação de seis meses (74, 78). Nossos resultados revelam que a relativa fase de quiescência da doença de Chagas no modelo animal analisado é mais curta do que havia sido sugerido por estudos anteriores.

O presente estudo é o primeiro a avaliar por ecocardiografia o desempenho sistólico do ventrículo direito em hamsters sírios infectados com *T. cruzi*. Nossos resultados mostram acometimento precoce dessa câmara cardíaca, corroborando achados prévios de estudos experimentais e estudos clínicos que utilizaram diferentes métodos de imagem. Um estudo com ecocardiografia demonstrou valores reduzidos de mudança fracional da área do ventrículo direito em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas em comparação a um grupo controle (101). Estudos anteriores utilizando ventriculografia radioisotópica demonstraram envolvimento do ventrículo direito em fases iniciais da evolução da doença de Chagas, mesmo na presença de função sistólica normal do ventrículo esquerdo (66, 102). Investigações com modelos experimentais de CCC e biópsias endomiocárdicas de pacientes com doença de Chagas também evidenciaram dano ao miocárdio do ventrículo direito (17, 103).

Por fim, os resultados apresentados demonstram correlação entre a quantidade de células inflamatórias presentes no tecido miocárdico ventricular esquerdo dos hamsters com doença de Chagas ao fim do protocolo de experimentação e os parâmetros ecocardiográficos de estrutura e função DSFVE, FEVE e GLS de oito meses após a infecção. Esses achados

estão de acordo com dados de um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa que evidenciaram correlação entre a quantidade de células inflamatórias e disfunção regional ou global do ventrículo esquerdo, sugerindo o papel essencial do processo inflamatório na doença de Chagas até suas fases mais tardias (78).

Limitações

6. LIMITAÇÕES

Apenas os animais que estavam vivos ao final do seguimento, com medidas ecocardiográficas em todos os períodos de tempo avaliados, foram incluídos na análise.

Os agentes anestésicos podem interferir nos valores de frequência cardíaca e em parâmetros de estrutura e função dos ventrículos. Contudo, não foram encontrados na literatura dados a respeito do efeito de diferentes agentes anestésicos nos índices de deformação miocárdica. Ainda, faz-se importante lembrar que não houve diferença significativa entre os valores de frequência cardíaca nos grupos controle e com doença de Chagas na presente investigação.

Em virtude de características intrínsecas do modelo experimental em hamsters sírios, as projeções apicais são encurtadas, não permitindo a visualização adequada dos segmentos apicais e, portanto, não são comumente utilizadas para as análises funcionais do ventrículo esquerdo, da mesma maneira que aconteceu na presente investigação com as análises de deformação miocárdica.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Os novos índices de avaliação da deformação miocárdica GLS e GCS estão significativamente alterados e se mostraram os parâmetros mais precoces para a detecção de dano miocárdico do ventrículo esquerdo em hamsters sírios infectados com *T. cruzi*.

O GRS não foi capaz de discriminar animais com doença de Chagas dos animais controles.

O DSFVE e a FEVE são parâmetros tradicionais de avaliação estrutural e funcional do ventrículo esquerdo, que também estão alterados neste modelo experimental da doença, porém incapazes de detectar dano miocárdico precoce.

No modelo experimental de hamsters sírios, o DSFVE e a FEVE mostraram diferenças entre os grupos (Chagas x controle) na avaliação de seis meses em diante. O período de quiescência, correspondente à forma indeterminada da doença de Chagas no modelo experimental avaliado, estende-se até o quinto mês após a infecção pelo *T. cruzi*.

O índice TAPSE foi um parâmetro em fases iniciais da doença de Chagas, demonstrando o envolvimento precoce do ventrículo direito e, provavelmente, não dependente do ventrículo esquerdo no modelo experimental estudado.

A inflamação está presente nos estágios avançados da CCC e mostrou correlação com o DSFVE, FEVE e GLS.

Como aspecto translacional, sugere-se a avaliação da deformação miocárdica pela técnica ecocardiográfica de rastreamento de pontos na prática clínica, de maneira sequencial, nos pacientes com doença de Chagas, independentemente da fase em que se encontram na evolução da doença.

Referências

8. REFERÊNCIAS

1. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec.* 2015;90(6):33-43.
2. Martins-Melo FR, Ramos AN, Jr., Alencar CH, Heukelbach J. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000-2011. *Bull World Health Organ.* 2016;94(2):103-10.
3. Global Burden of Disease Study C. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015;386(9995):743-800.
4. Dias JCP. Human Chagas disease and migration in the context of globalization: some particular aspects. *Journal of Tropical Medicine.* 2013;2013:9.
5. Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(4):655-81.
6. Strasen J, Williams T, Ertl G, Zoller T, Stich A, Ritter O. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. *Clin Res Cardiol.* 2014;103(1):1-10.
7. Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(4):342-8.
8. Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104 Suppl 1:152-8.
9. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 2007;115(9):1109-23.
10. Rossi MA. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas' disease. *Am Heart J.* 1990;120(1):233-6.
11. Rossi MA, Goncalves S, Ribeiro-dos-Santos R. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. *Am J Pathol.* 1984;114(2):209-16.
12. Tanowitz HB, Burns ER, Sinha AK, Kahn NN, Morris SA, Factor SM, et al. Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg.* 1990;43(3):274-81.
13. Tanowitz HB, Kaul DK, Chen B, Morris SA, Factor SM, Weiss LM, et al. Compromised microcirculation in acute murine *Trypanosoma cruzi* infection. *J Parasitol.* 1996;82(1):124-30.
14. Ribeiro AL, Gimenez LE, Hernandez CC, de Carvalho AC, Teixeira MM, Guedes VC, et al. Early occurrence of anti-muscarinic autoantibodies and abnormal vagal modulation in Chagas disease. *Int J Cardiol.* 2007;117(1):59-63.
15. Ribeiro AL, Moraes RS, Ribeiro JP, Ferlin EL, Torres RM, Oliveira E, et al. Parasympathetic dysautonomia precedes left ventricular systolic dysfunction in Chagas disease. *Am Heart J.* 2001;141(2):260-5.
16. Baroldi G, Oliveira SJ, Silver MD. Sudden and unexpected death in clinically 'silent' Chagas' disease. A hypothesis. *Int J Cardiol.* 1997;58(3):263-8.
17. Carrasco Guerra HA, Palacios-Pru E, Dagert de Scorza C, Molina C, Inglessis G, Mendoza RV. Clinical, histochemical, and ultrastructural correlation in septal endomyocardial biopsies from chronic chagasic patients: detection of early myocardial damage. *Am Heart J.* 1987;113(3):716-24.
18. Pereira Barretto AC, Mady C, Arteaga-Fernandez E, Stolf N, Lopes EA, Higuchi ML, et al. Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. *Am Heart J.* 1986;111(2):307-12.
19. Higuchi ML, De Moraes CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol.* 1987;10(11):665-70.
20. Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol.* 2001;31(5-6):550-4.

21. Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity*. 2006;39(1):41-54.
22. Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin Invest*. 1996;98(8):1709-12.
23. Biolo A, Ribeiro AL, Clausell N. Chagas cardiomyopathy--where do we stand after a hundred years? *Prog Cardiovasc Dis*. 2010;52(4):300-16.
24. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. 2001;1(2):92-100.
25. Rassi A, Jr., Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375(9723):1388-402.
26. Parada H, Carrasco HA, Anez N, Fuenmayor C, Inglessis I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int J Cardiol*. 1997;60(1):49-54.
27. Dias JC. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1989;22(3):147-56.
28. Ministerio da Saude. Secretaria de Vigilancia em S. [Brazilian Consensus on Chagas disease]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38 Suppl 3:7-29.
29. Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl 1:113-22.
30. Ribeiro AL, Rocha MO. [Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998;31(3):301-14.
31. Sabino EC, Ribeiro AL, Salemi VM, Di Lorenzo Oliveira C, Antunes AP, Menezes MM, et al. Ten-year incidence of Chagas cardiomyopathy among asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-seropositive former blood donors. *Circulation*. 2013;127(10):1105-15.
32. Andrade JP, Marin-Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F, et al. [I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy]. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(2 Suppl 3):1-48.
33. Punukollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol*. 2007;115(3):279-83.
34. Ribeiro AL, Marcolino MS, Prineas RJ, Lima-Costa MF. Electrocardiographic abnormalities in elderly Chagas disease patients: 10-year follow-up of the Bambui Cohort Study of Aging. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(1):e000632.
35. Ribeiro AL, Sabino EC, Marcolino MS, Salemi VM, Ianni BM, Fernandes F, et al. Electrocardiographic abnormalities in *Trypanosoma cruzi* seropositive and seronegative former blood donors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(2):e2078.
36. Rassi A, Jr., Rassi A, Rassi SG. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation*. 2007;115(9):1101-8.
37. Nunes Mdo C, Rocha MO, Ribeiro AL, Colosimo EA, Rezende RA, Carmo GA, et al. Right ventricular dysfunction is an independent predictor of survival in patients with dilated chronic Chagas' cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2008;127(3):372-9.
38. Rassi A, Jr., Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med*. 2006;355(8):799-808.
39. Villa L, Morote S, Bernal O, Bulla D, Albajar-Vinas P. Access to diagnosis and treatment of Chagas disease/infection in endemic and non-endemic countries in the XXI century. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl 1:87-94.
40. Acquatella H. Echocardiography in Chagas heart disease. *Circulation*. 2007;115(9):1124-31.
41. Barros MV, da Costa Rocha MO, Ribeiro AL, Machado FS. Tissue Doppler imaging enables the identification of diastolic dysfunction of pseudonormal pattern in Chagas' disease. *J Am Soc Echocardiogr*. 2001;14(5):353-9.
42. Barros MV, Machado FS, Ribeiro AL, Rocha MO. Diastolic function in Chagas' disease: an echo and tissue Doppler imaging study. *Eur J Echocardiogr*. 2004;5(3):182-8.

43. Nunes MC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL, Council on Chagas Disease of the Interamerican Society of C. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(9):767-76.
44. Viotti RJ, Vigliano C, Laucella S, Lococo B, Petti M, Bertocchi G, et al. Value of echocardiography for diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease cardiomyopathy without heart failure. *Heart*. 2004;90(6):655-60.
45. Pazin-Filho A, Romano MM, Almeida-Filho OC, Furuta MS, Viviani LF, Schmidt A, et al. Minor segmental wall motion abnormalities detected in patients with Chagas' disease have adverse prognostic implications. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39(4):483-7.
46. Nunes MC, Carmo AA, Rocha MO, Ribeiro AL. Mortality prediction in Chagas heart disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2012;10(9):1173-84.
47. Nunes MC, Reis RC, Colosimo EA, Ribeiro AL, Barbosa FB, da Silva JL, et al. Risk estimation approach in Chagas disease is still needed. *Int J Cardiol*. 2011;147(2):294-6.
48. Nascimento CA, Gomes VA, Silva SK, Santos CR, Chambela MC, Madeira FS, et al. Left atrial and left ventricular diastolic function in chronic Chagas disease. *J Am Soc Echocardiogr*. 2013;26(12):1424-33.
49. Nunes MC, Barbosa MM, Ribeiro AL, Colosimo EA, Rocha MO. Left atrial volume provides independent prognostic value in patients with Chagas cardiomyopathy. *J Am Soc Echocardiogr*. 2009;22(1):82-8.
50. Pazin-Filho A, Romano MM, Gomes Furtado R, de Almeida Filho OC, Schmidt A, Marin-Neto JA, et al. Left ventricular global performance and diastolic function in indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease. *J Am Soc Echocardiogr*. 2007;20(12):1338-43.
51. Cikes M, Solomon SD. Beyond ejection fraction: an integrative approach for assessment of cardiac structure and function in heart failure. *Eur Heart J*. 2016;37(21):1642-50.
52. Greenbaum RA, Ho SY, Gibson DG, Becker AE, Anderson RH. Left ventricular fibre architecture in man. *Br Heart J*. 1981;45(3):248-63.
53. Aurigemma GP, Silver KH, Priest MA, Gaasch WH. Geometric changes allow normal ejection fraction despite depressed myocardial shortening in hypertensive left ventricular hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*. 1995;26(1):195-202.
54. Fang ZY, Leano R, Marwick TH. Relationship between longitudinal and radial contractility in subclinical diabetic heart disease. *Clin Sci (Lond)*. 2004;106(1):53-60.
55. Goncalves S, Cortez-Dias N, Nunes A, Belo A, Zimbarra Cabrita I, Sousa C, et al. Left ventricular systolic dysfunction detected by speckle tracking in hypertensive patients with preserved ejection fraction. *Rev Port Cardiol*. 2014;33(1):27-37.
56. Kraigher-Krainer E, Shah AM, Gupta DK, Santos A, Claggett B, Pieske B, et al. Impaired systolic function by strain imaging in heart failure with preserved ejection fraction. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(5):447-56.
57. Mizuguchi Y, Oishi Y, Miyoshi H, Iuchi A, Nagase N, Oki T. The functional role of longitudinal, circumferential, and radial myocardial deformation for regulating the early impairment of left ventricular contraction and relaxation in patients with cardiovascular risk factors: a study with two-dimensional strain imaging. *J Am Soc Echocardiogr*. 2008;21(10):1138-44.
58. Amundsen BH, Helle-Valle T, Edvardsen T, Torp H, Crosby J, Lyseggen E, et al. Noninvasive myocardial strain measurement by speckle tracking echocardiography: validation against sonomicrometry and tagged magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(4):789-93.
59. Hasselberg NE, Haugaa KH, Bernard A, Ribe MP, Kongsgaard E, Donal E, et al. Left ventricular markers of mortality and ventricular arrhythmias in heart failure patients with cardiac resynchronization therapy. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2016;17(3):343-50.
60. Feigenbaum H, Mastouri R, Sawada S. A practical approach to using strain echocardiography to evaluate the left ventricle. *Circ J*. 2012;76(7):1550-5.
61. Kouzu H, Yuda S, Muranaka A, Doi T, Yamamoto H, Shimoshige S, et al. Left ventricular hypertrophy causes different changes in longitudinal, radial, and circumferential mechanics in

patients with hypertension: a two-dimensional speckle tracking study. *J Am Soc Echocardiogr.* 2011;24(2):192-9.

62. Nakai H, Takeuchi M, Nishikage T, Lang RM, Otsuji Y. Subclinical left ventricular dysfunction in asymptomatic diabetic patients assessed by two-dimensional speckle tracking echocardiography: correlation with diabetic duration. *Eur J Echocardiogr.* 2009;10(8):926-32.

63. Serri K, Reant P, Lafitte M, Berhouet M, Le Bouffos V, Roudaut R, et al. Global and regional myocardial function quantification by two-dimensional strain: application in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(6):1175-81.

64. Nunes MCP, Badano LP, Marin-Neto JA, Edvardsen T, Fernandez-Golfín C, Bucciarelli-Ducci C, et al. Multimodality imaging evaluation of Chagas disease: an expert consensus of Brazilian Cardiovascular Imaging Department (DIC) and the European Association of Cardiovascular Imaging (EACVI). *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2017.

65. Lopes ER, Rocha A, Adad SJ, Fernandes EL, Chapadeiro E. [Necroscopic study of a case of chronic form of Chagas disease with electrocardiogram and x-rays of normal thorax. Special reference to the excitatory-conductor system of the heart]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1988;21(2):67-70.

66. Marin-Neto JA, Marzullo P, Sousa AC, Marcassa C, Maciel BC, Iazigi N, et al. Radionuclide angiographic evidence for early predominant right ventricular involvement in patients with Chagas' disease. *Can J Cardiol.* 1988;4(5):231-6.

67. Koberle F. [The chronic Chagas cardiopathy]. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med.* 1957;330(3):267-95.

68. Koberle F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol.* 1968;6:63-116.

69. Marin-Neto JA, Andrade ZA. [Why is there predominance of right heart failure in Chagas' disease?]. *Arq Bras Cardiol.* 1991;57(3):181-3.

70. Nunes Mdo C, Barbosa Mde M, Brum VA, Rocha MO. Morphofunctional characteristics of the right ventricle in Chagas' dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2004;94(1):79-85.

71. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afzalpoor J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2015;16(3):233-70.

72. Leong DP, Grover S, Molaei P, Chakraborty A, Shirazi M, Cheng YH, et al. Nonvolumetric echocardiographic indices of right ventricular systolic function: validation with cardiovascular magnetic resonance and relationship with functional capacity. *Echocardiography.* 2012;29(4):455-63.

73. Moreira HT, Volpe GJ, Marin-Neto JA, Ambale-Venkatesh B, Nwabuo CC, Trad HS, et al. Evaluation of Right Ventricular Systolic Function in Chagas Disease Using Cardiac Magnetic Resonance Imaging. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2017;10(3).

74. Bilate AM, Salemi VM, Ramires FJ, de Brito T, Silva AM, Umezawa ES, et al. The Syrian hamster as a model for the dilated cardiomyopathy of Chagas' disease: a quantitative echocardiographical and histopathological analysis. *Microbes Infect.* 2003;5(12):1116-24.

75. Ramirez LE, Lages-Silva E, Soares Junior JM, Chapadeiro E. The hamster (*Mesocricetus auratus*) as experimental model in Chagas' disease: parasitological and histopathological studies in acute and chronic phases of *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1994;27(3):163-9.

76. Bilate AM, Salemi VM, Ramires FJ, de Brito T, Russo M, Fonseca SG, et al. TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Microbes Infect.* 2007;9(9):1104-13.

77. Colmanetti FH, Teixeira Vde P, Rodrigues ML, Chica JE, Reis M, dos Santos VM. Myocardiocyte ultrastructure and morphometrical analysis in hamsters experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Ultrastruct Pathol.* 2005;29(2):139-47.

78. de Oliveira LF, Romano MM, de Carvalho EE, Cabeza JM, Salgado HC, Fazan Junior R, et al. Histopathological Correlates of Global and Segmental Left Ventricular Systolic Dysfunction in Experimental Chronic Chagas Cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(1).

79. De Souza AP, Tanowitz HB, Chandra M, Shtutin V, Weiss LM, Morris SA, et al. Effects of early and late verapamil administration on the development of cardiomyopathy in experimental chronic *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain) infection. *Parasitol Res.* 2004;92(6):496-501.
80. Prado CM, Fine EJ, Koba W, Zhao D, Rossi MA, Tanowitz HB, et al. Micro-positron emission tomography in the evaluation of *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease: Comparison with other modalities. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(5):900-5.
81. Chapadeiro E, Beraldo PS, Jesus PC, Oliveira Junior WP, Junqueira Junior LF. [Cardiac lesions in Wistar rats inoculated with various strains of *Trypanosoma cruzi*]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1988;21(3):95-103.
82. Brener Z. (Comparative Studies of Different Strains of *Trypanosoma Cruzi*.). *Ann Trop Med Parasitol.* 1965;59:19-26.
83. Brener Z, Chiari E. Aspects of early growth of different *Trypanosoma cruzi* strains in culture medium. *J Parasitol.* 1965;51(6):922-6.
84. Voigt JU, Pedrizzetti G, Lysyansky P, Marwick TH, Houle H, Baumann R, et al. Definitions for a common standard for 2D speckle tracking echocardiography: consensus document of the EACVI/ASE/Industry Task Force to standardize deformation imaging. *J Am Soc Echocardiogr.* 2015;28(2):183-93.
85. Blessberger H, Binder T. Two dimensional speckle tracking echocardiography: clinical applications. *Heart.* 2010;96(24):2032-40.
86. Blessberger H, Binder T. NON-invasive imaging: Two dimensional speckle tracking echocardiography: basic principles. *Heart.* 2010;96(9):716-22.
87. Group NCRGW. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *J Physiol.* 2010;588(Pt 14):2519-21.
88. Tanaka DM, Romano MM, Carvalho EE, Oliveira LF, Souza HC, Maciel BC, et al. Effect of different anesthetic agents on left ventricular systolic function assessed by echocardiography in hamsters. *Braz J Med Biol Res.* 2016;49(10):e5294.
89. Teichholz LE, Kreulen T, Herman MV, Gorlin R. Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence of absence of asynergy. *Am J Cardiol.* 1976;37(1):7-11.
90. Bauer M, Cheng S, Jain M, Ngoy S, Theodoropoulos C, Trujillo A, et al. Echocardiographic speckle-tracking based strain imaging for rapid cardiovascular phenotyping in mice. *Circ Res.* 2011;108(8):908-16.
91. Regueiro A, Garcia-Alvarez A, Sitges M, Ortiz-Perez JT, De Caralt MT, Pinazo MJ, et al. Myocardial involvement in Chagas disease: insights from cardiac magnetic resonance. *Int J Cardiol.* 2013;165(1):107-12.
92. Rochitte CE, Nacif MS, de Oliveira Junior AC, Siqueira-Batista R, Marchiori E, Uellendahl M, et al. Cardiac magnetic resonance in Chagas' disease. *Artif Organs.* 2007;31(4):259-67.
93. Gomes VA, Alves GF, Hadlich M, Azevedo CF, Pereira IM, Santos CR, et al. Analysis of Regional Left Ventricular Strain in Patients with Chagas Disease and Normal Left Ventricular Systolic Function. *J Am Soc Echocardiogr.* 2016;29(7):679-88.
94. Lima MS, Villarraga HR, Abduch MC, Lima MF, Cruz CB, Bittencourt MS, et al. Comprehensive left ventricular mechanics analysis by speckle tracking echocardiography in Chagas disease. *Cardiovasc Ultrasound.* 2016;14(1):20.
95. Barbosa MM, Costa Rocha MO, Vidigal DF, Bicalho Carneiro Rde C, Araujo RD, Palma MC, et al. Early detection of left ventricular contractility abnormalities by two-dimensional speckle tracking strain in Chagas' disease. *Echocardiography.* 2014;31(5):623-30.
96. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Jr., Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2015;373(14):1295-306.
97. Jannin J, Villa L. An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102 Suppl 1:95-7.
98. Moreira HT, Nwabuo CC, Armstrong AC, Kishi S, Gjesdal O, Reis JP, et al. Reference Ranges and Regional Patterns of Left Ventricular Strain and Strain Rate Using Two-Dimensional Speckle-

Tracking Echocardiography in a Healthy Middle-Aged Black and White Population: The CARDIA Study. *J Am Soc Echocardiogr.* 2017;30(7):647-58 e2.

99. Garcia-Alvarez A, Sitges M, Regueiro A, Poyatos S, Jesus Pinazo M, Posada E, et al. Myocardial deformation analysis in Chagas heart disease with the use of speckle tracking echocardiography. *J Card Fail.* 2011;17(12):1028-34.

100. Gascon J, Albajar P, Canas E, Flores M, Gomez i Prat J, Herrera RN, et al. [Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic]. *Rev Esp Cardiol.* 2007;60(3):285-93.

101. Furtado RG, Frota Ddo C, Silva JB, Romano MM, Almeida Filho OC, Schmidt A, et al. Right ventricular Doppler echocardiographic study of indeterminate form of chagas disease. *Arq Bras Cardiol.* 2015;104(3):209-17.

102. Marin-Neto JA, Bromberg-Marin G, Pazin-Filho A, Simoes MV, Maciel BC. Cardiac autonomic impairment and early myocardial damage involving the right ventricle are independent phenomena in Chagas' disease. *Int J Cardiol.* 1998;65(3):261-9.

103. Jelicks LA, Shirani J, Wittner M, Chandra M, Weiss LM, Factor SM, et al. Application of cardiac gated magnetic resonance imaging in murine Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(2):207-14.

9. ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 013/2015-1, sobre o projeto intitulado "*Cardiomiopatia chagásica crônica em modelo experimental animal: estudo prospectivo das alterações geométricas e funcionais ventriculares e do efeito de intervenções terapêuticas*", sob a responsabilidade da **Professora Doutora Minna Moreira Dias Romano** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de janeiro de 2016.

We certify that the protocol nº 013/2015-1, entitled "*Chronic chagasic cardiomyopathy in an experimental animal model: prospective study of the geometric and functional changes and of the therapeutic interventions*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo on 01/27/2016.

Ribeirão Preto, 27 de janeiro de 2016.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP