**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

ANTONIO CARLOS LEITE DE BARROS FILHO

**Exequibilidade e definição de intervalos de referência
para variáveis ecocardiográficas convencionais e de
deformação miocárdica pelo método de rastreamento
de pontos em hamsters sírios adultos**

RIBEIRÃO PRETO

2017

ANTONIO CARLOS LEITE DE BARROS FILHO

**Exequibilidade e definição de intervalos de referência
para variáveis ecocardiográficas convencionais e de
deformação miocárdica pelo método de rastreamento
de pontos em hamsters sírios adultos**

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

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: Profa. Dra. Minna
Moreira Dias Romano

RIBEIRÃO PRETO

2017

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Barros-Filho, Antonio Carlos Leite de

Exequibilidade e definição de intervalos de referência para variáveis ecocardiográficas convencionais e de deformação miocárdica pelo método de rastreamento de pontos em hamsters sírios adultos. Antonio Carlos Leite de Barros Filho / Orientadora: Minna Moreira Dias Romano - Ribeirão Preto, 2017.

100p.: 12il. 30 cm

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

1. Ecocardiografia; 2. Hamsters; 3. Modelo experimental.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Antonio Carlos Leite de Barros Filho

Título: Exequibilidade e definição de intervalos de referência para variáveis ecocardiográficas convencionais e de deformação miocárdica pelo método de rastreamento de pontos em hamsters sírios adultos.

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

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura _____

Dedicatória

À minha esposa, Fabiana, pelo Amor e pelo apoio incondicional.

Aos meus pais, Antonio e Janice, que me transmitiram o valor do trabalho e do estudo.

Às minhas irmãs Renata, Sabrina e Emília, pelo exemplo e companheirismo.

Agradecimentos

Agradeço,

À minha família.

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

Aos meus colaboradores de pesquisa Fernando Fonseca Ribeiro e Denise Mayumi Tanaka.

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.

Aos funcionários do Departamento da Divisão de Cardiologia, em especial aos funcionários do Laboratório de Ecocardiografia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos meus colegas e amigos.

Resumo

BARROS-FILHO, A. C. L. **Exequibilidade e definição de intervalos de referência para variáveis ecocardiográficas convencionais e de deformação miocárdica pelo método de rastreamento de pontos em hamsters sírios adultos.** 2017. 100f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2017.

O hamster sírio é utilizado como modelo experimental que permite explorar aspectos fisiopatológicos e avaliar a resposta terapêutica em diversas cardiopatias, algumas delas não tão bem reproduzidas em ratos. A avaliação cardiológica inclui a observação de aspectos fisiológicos e hemodinâmicos, assim como a utilização de exames complementares para análise estrutural e funcional cardíaca *in vivo*. Dentre esses exames destaca-se a ecocardiografia, que possibilita a avaliação da estrutura e função com elevada acurácia. Uma das formas de análise da função sistólica é por meio do cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), que leva em consideração os volumes estimados diastólico final e sistólico final do ventrículo esquerdo. Outro importante parâmetro de análise de função sistólica é a avaliação da deformação miocárdica. Os índices de deformação miocárdica podem ser obtidos utilizando o método de rastreamento de pontos. No entanto, até o presente momento, não existem dados a respeito de valores de referência a serem utilizados para a deformação miocárdica em hamsters. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo definir a exequibilidade, os intervalos de referência e a variabilidade de parâmetros derivados da ecocardiografia convencional e da técnica de rastreamento de pontos em hamsters sírios adultos. **Métodos:** Foram incluídos no estudo 135 hamsters sírios fêmeas, anestesiados com ketamina/xilazina e submetidos à ecocardiografia em aparelho dedicado a pequenos animais, Vevo[®] 2100 utilizando transdutor linear de 30 MHz. **Resultados:** A exequibilidade da realização das medidas de ecocardiografia convencional foi superior a 93%. A análise da deformação endocárdica apresentou exequibilidade de 84% no eixo longo e, de 80% no eixo curto. A avaliação da deformação epicárdica nos eixos longo e curto apresentou baixa exequibilidade (42% e 62%, respectivamente). A FEVE pelo modo M, obtida no eixo longo, foi significativamente superior à obtida pelos métodos de área comprimento e de rastreamento de pontos ($59,0 \pm 5,8$; $53,8 \pm 4,7$; $46,3 \pm 5,7$; $p < 0,0001$). Houve razoável correlação positiva da FEVE obtida pelos métodos de área comprimento e de rastreamento de pontos ($r = +0,43$; $p < 0,0001$). A deformação longitudinal endocárdica global foi de $-13,6(-7,5; -20,4)\%$, a deformação circunferencial endocárdica global foi de $-20,5 \pm 3,1\%$ e a deformação radial endocárdica global foi de $+34,7 \pm 7,0\%$. A análise de regressão linear evidenciou influência da frequência cardíaca nos valores de deformação longitudinal e circunferencial, mas não da deformação radial ($p = 0,0003$; $p < 0,0001$ e $p = 0,83$, respectivamente). **Conclusões:** Demonstrou-se que as medidas de ecocardiografia convencional e pelo método de rastreamento de pontos são exequíveis em hamsters. Foram definidos intervalos de referência para variáveis de ecocardiografia convencional e da deformação endocárdica global longitudinal, circunferencial e radial neste modelo experimental animal.

Palavras-chave: Ecocardiografia. Hamsters. Modelo experimental.

Abstract

BARROS-FILHO, A. C. L. **Feasibility and reference intervals for conventional echocardiography measures and myocardial strain by Speckle tracking in adult Syrians hamsters.** 2017. 100f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2017.

The Syrian hamster is an experimental model to study pathophysiology and to assess therapeutic response in several heart diseases, some of them not well reproduced in rats. The cardiologic evaluation includes observation of physiological and hemodynamic patterns, and complementary tests are used for *in vivo* cardiac structural and functional analysis. Among these, echocardiography allows the evaluation of structure and function with high accuracy. Analyzing systolic function can be done by calculating the left ventricular ejection fraction. Another important parameter of systolic function analysis is the assessment of the myocardial strain. Myocardial strain indices can be obtained using speckle tracking. However, there are no data regarding reference values for myocardial strain in hamsters. The present study aimed to determine feasibility, reference intervals and variability of parameters derived from conventional and speckle tracking echocardiography in adult Syrian hamsters. **Methods:** The study included 135 female Syrian hamsters anesthetized with ketamine/xylazine and submitted to a small animal dedicated echocardiography, Vevo® 2100 using a 30 MHz linear transducer. **Results:** The analysis of the endocardial strain presented a feasibility of 84% in the long axis and 80% in the short axis. The evaluation of the epicardial strain in the long and short axes presented low feasibility (42% and 62%, respectively). The M-mode left ventricular ejection fraction obtained on the long axis was significantly higher than that obtained by the area-length and Speckle tracking methods (59.0 ± 5.8 , 53.8 ± 4.7 , 46.3 ± 5.7 , $p < 0.0001$). There was a reasonable positive correlation of left ventricular ejection fraction obtained by the area length method and the Speckle tracking method ($r = +0.43$; $p < 0.0001$). The endocardial longitudinal strain was $-13.6 (-7.5; -20.4)\%$, the endocardial circumferential strain was $-20.5 \pm 3.1\%$ and the endocardial radial strain was $+34.7 \pm 7.0\%$. Linear regression analysis showed influence of heart rate on the values of longitudinal and circumferential strain, but not on radial strain ($p = 0.0003$, $p < 0.0001$ and $p = 0.83$, respectively). **Conclusions:** it has been shown that measurements of conventional echocardiography and speckle tracking are feasible in hamsters. Reference intervals for conventional echocardiographic variables and longitudinal, circumferential and radial global endocardial strain were obtained in this experimental animal model.

Key-words: Echocardiography. Hamsters. Experimental model.

Lista de Figuras

Figura 1 -	Modo M do ventrículo esquerdo na janela paraesternal longitudinal em hamster.....	23
Figura 2 -	Cálculo dos volumes do ventrículo esquerdo em humanos pelo método de Simpson biplanar	25
Figura 3 -	Cálculo dos volumes do ventrículo esquerdo em hamster pelo método de Área comprimento. (A) Imagem em diástole. (B) Imagem em sístole.....	26
Figura 4 -	Cálculo dos volumes em hamster pela técnica de rastreamento de pontos. (A) Imagem em diástole. (B) Imagem em sístole. (C) Curvas de volume	30
Figura 5 -	Representação do ventrículo esquerdo em hamsters nos cortes paraesternal eixo longo e paraesternal eixo curto	33
Figura 6 -	Equipamentos utilizados para a realização do exame ecocardiográfico: (A) Vevo® 2100; (B) transdutor linear de 30 MHz	40
Figura 7 -	Equipamentos utilizados: (A) Mesa com superfície aquecida e inclinável	40
Figura 8 -	Exemplos de imagens bidimensionais em hamsters. (A) Imagem paraesternal em eixo longo. (B) Imagem paraesternal em eixo curto.....	41
Figura 9 -	Análise da deformação miocárdica em hamsters. Conferência do traçado endocárdico (contorno branco) e epicárdio (contorno verde) nos eixos longo (A) e curto (B)	44
Figura 10 -	Análise da deformação endocárdica global e segmentar na janela paraesternal eixo longo em hamsters. (A) Curvas de deformação longitudinal. (B) Valores de deformação longitudinal...	45
Figura 11 -	Análise da deformação endocárdica global e segmentar na janela paraesternal eixo curto em hamsters. (A) Curvas de deformação radial. (B) Valores de deformação radial. (C) Curvas de deformação circunferencial. (D) Valores de deformação circunferencial.....	46
Figura 12 -	Fluxograma ilustrando a população de animais do estudo	50

Lista de Gráficos

Gráfico 1:	Representação gráfica da exequibilidade da deformação no eixo longo por camada e por segmento em hamsters.....	53
Gráfico 2:	Representação gráfica da exequibilidade da deformação no eixo curto por camada e por segmento em hamsters	53
Gráfico 3:	Histograma de frequências do cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) pelo método de Teichholz para quantificação de volume em hamsters	55
Gráfico 4:	Histograma de frequências do cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) pelo método de área comprimento para quantificação de volume em hamsters	55
Gráfico 5:	Histograma de frequências do cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) pelo método de rastreamento de pontos para quantificação de volume em hamsters.....	56
Gráfico 6:	Representação gráfica da fração de ejeção do ventrículo esquerdo obtida por diferentes métodos de quantificação de volume em hamsters. (A) Teichholz; (B) Área comprimento; (C) Rastreamento de pontos	57
Gráfico 7:	Gráfico de dispersão e correlação de Pearson (r) entre as medidas da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) quando realizada a quantificação do volume pelos métodos de área comprimento e de rastreamento de pontos em hamsters	58
Gráfico 8:	Gráficos de dispersão de Bland-Altman. Análise intraobservador de parâmetros de geometria do ventrículo esquerdo em hamsters.....	62
Gráfico 9:	Gráficos de dispersão de Bland-Altman. Análise intraobservador para o cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo por diferentes métodos de quantificação de volume em hamsters	63
Gráfico 10:	Gráficos de dispersão de Bland-Altman. Análise intraobservador para a deformação endocárdica global em hamsters	64

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Características da amostra.....	51
Tabela 2 -	Exequibilidade de parâmetros ecocardiográficos de geometria e função ventricular esquerda em hamsters.....	51
Tabela 3 -	Exequibilidade da deformação miocárdica na eixo longo em hamsters.....	52
Tabela 4 -	Exequibilidade da deformação miocárdica no eixo curto em hamsters.....	54
Tabela 5 -	Intervalos de referência para variáveis ecocardiográficas de geometria e função ventricular esquerda em hamsters.....	56
Tabela 6 -	Intervalos de referência da deformação global endocárdica em hamsters.....	58
Tabela 7 -	Análise de regressão linear para os parâmetros de geometria e função do ventrículo esquerdo em hamsters.....	59
Tabela 8 -	Análise de regressão linear para os parâmetros de deformação endocárdica em hamsters	60
Tabela 9 -	Análise da variabilidade interobservador e intraobservador em hamsters.....	61

Lista de Símbolos e Abreviaturas

%-	Porcentagem
®-	Marca registrada
A-	Área planimetrada
AA-	Ântero apical
AB-	Anterior basal
AE-	Átrio esquerdo
AM-	Anterior médio
AL-	Ântero lateral
Ant-	Anterior
Bpm-	Batimentos por minuto
CCI-	Coeficiente de correlação intraclasse
CV-	Coeficiente de variação
D-	Diâmetro
DDFVE-	Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo
DP-	Desvio padrão
DSFVE-	Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo
EC-	Eixo curto
EL-	Eixo longo
EP-	Erro padrão
FC-	Frequência cardíaca
FEVE-	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FMRP-USP-	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
G-	gramas
Hz-	Hertz
IA-	Íntero apical
IB-	Inferior basal

IIQ-	Intervalo interquartil
IL-	Ífero lateral
IM-	Inferior médio
Inf	Inferior
IR-	Intervalos de referência
L-	Comprimento longitudinal do ventrículo esquerdo
L0-	Comprimento inicial
L1-	Comprimento final
Ln-	Logaritmo natural
mg/dl-	Miligramas por decilitros
mg/hg-	Miligramas por hectogramas
MHz-	Megahertz
PPVE-	Parede posterior do ventrículo esquerdo
Qps-	Quadros por segundo
Sant-	Septo anterior
S_c-	Deformação circunferencial
SI-	Septo inferior
SIV-	Septo interventricular
S_l-	Deformação longitudinal
S_r-	Deformação radial
VD-	Ventrículo direito
VDFVE-	Volume diastólico final do ventrículo esquerdo
VE-	Ventrículo esquerdo
Vol-	Volume
VSFVE-	Volume sistólico final do ventrículo esquerdo
ε-	Deformação langrangiana
ε' -	Deformação natural

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Avaliação da estrutura ventricular esquerda pela ecocardiografia	22
1.2. Métodos convencionais de avaliação da função sistólica do ventrículo esquerdo pela ecocardiografia	23
1.2.1. Fração de encurtamento.....	24
1.2.2. Fração de ejeção do ventrículo esquerdo.....	24
1.3. Utilização da técnica de rastreamento de pontos para a avaliação da deformação miocárdica e da fração de ejeção do ventrículo esquerdo pela ecocardiografia	28
1.3.1. Análise da deformação miocárdica.....	28
1.3.2. Avaliação da fração de ejeção do ventrículo	29
1.3.3. Definições	30
1.3.4. Deformação langrangiana e deformação natural	32
1.3.5. Aspectos técnicos	32
2. OBJETIVOS.....	35
2.1. Objetivo geral.....	36
2.2. Objetivos específicos	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. Característica da amostra e aspectos éticos.....	39
3.2. Ecocardiografia - aquisição das imagens.....	39
3.3. Medidas de ecocardiografia convencional de geometria e função ventricular	42
3.4. Análise pela técnica de rastreamento de pontos	42
3.5. Análise da exequibilidade	46
3.6. Análise estatística	47
4. RESULTADOS	49
4.1. Avaliação da exequibilidade.....	51
4.2. Definição de intervalos de referência	54
4.3. Avaliação da variabilidade interobservador e intraobservador	60
5. DISCUSSÃO.....	65
5.1. Avaliação da exequibilidade.....	68
5.2. Avaliação da estrutura ventricular esquerda	69
5.3. Avaliação da fração de ejeção do ventrículo esquerdo	71
5.4. Análise da deformação miocárdica	72
5.5. Limitações	75
6. CONCLUSÕES.....	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
8. ANEXO	91
9 APÊNDICES	93

1 - Introdução

O hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) é utilizado como modelo experimental animal de diversas cardiopatias, como a cardiomiopatia dilatada e a cardiomiopatia chagásica crônica(1-4). Nesta última, apresenta superioridade em relação a outros modelos experimentais animais pela maior semelhança histológica e morfológica com a doença crônica que se apresenta em humanos; permitindo, dessa forma, o estudo de mecanismos fisiológicos e patológicos; sendo também utilizado para avaliar a resposta terapêutica a diversos fármacos em cardiologia(4-13).

A avaliação da função cardíaca em estudos experimentais animais, inicialmente, se baseava na análise de parâmetros fisiológicos, como a medida da frequência cardíaca (FC), da função autonômica, da pressão arterial, ou ainda, em medidas hemodinâmicas invasivas como o cálculo do débito cardíaco. Entretanto, o advento de métodos diagnósticos por imagem não invasivos como ressonância magnética cardíaca, tomografia computadorizada, tomografia computadorizada com emissão de pósitrons e ecocardiografia, representou uma revolução nesse cenário de pesquisa; possibilitando a análise simultânea *in vivo* de alterações estruturais e funcionais cardíacas(14-19); principalmente, com o desenvolvimento dos mesmos métodos usados em humanos em equipamentos dedicados a pequenos animais(20,21).

A ecocardiografia destaca-se dentre tais métodos não invasivos de análise de estrutura e função cardíaca por imagem devido a sua elevada praticidade e disponibilidade, associadas ao baixo custo operacional(22). Essas vantagens, já extremamente exploradas em cenários clínicos, atualmente também têm sido aplicadas em laboratórios de experimentação animal em situações científicas diversas(23-26). A ecocardiografia permite a avaliação das dimensões, da geometria e da função sistólica e diastólica dos ventrículos. Além disso, possibilita estudar os fluxos valvares com a utilização dos métodos Doppler. Apesar de recentemente disponível no cenário experimental animal, a ecocardiografia tridimensional, ainda é um recurso de alto custo e não está disponível na maioria dos centros de pesquisa.

1.1 Avaliação da estrutura ventricular esquerda pela ecocardiografia

A ecocardiografia permite a avaliação da estrutura e da geometria ventricular esquerda pela medida do diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE), do diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE) e pela estimativa da massa do ventrículo esquerdo (VE).

A hipertrofia ventricular esquerda é um importante marcador prognóstico de morbidade e mortalidade cardiovascular(27). Habitualmente, é estimada subtraindo-se o volume cavitário delimitado pelo epicárdio do volume cavitário delimitado pelo endocárdio, multiplicando-se o volume resultante pela densidade do tecido cardíaco(28). Para sua estimativa são necessárias as medidas da espessura do septo interventricular (SIV), do DDFVE e da parede posterior do ventrículo esquerdo (PPVE), que podem ser obtidas por meio do modo bidimensional ou do modo M (Figura 1), este último foi o primeiro a ser descrito e utilizado na maioria dos estudos prognósticos(29).

Existem diferentes fórmulas que podem ser utilizadas para a estimativa da massa do VE a partir dos diâmetros acima descritos. A primeira delas foi descrita por Troy et al. (1972)(30). A seguir, Devereux et al. (1977)(31) propuseram uma modificação no cálculo, baseados em estudo comparativo com necropsias. Posteriormente, uma nova mudança foi proposta por Devereux et al. (1986)(32), após a adequada padronização das medidas dos diâmetros e espessuras, resultando na fórmula mais utilizada até os dias de hoje na prática clínica e em estudos experimentais animais(33,34):

$$\text{Massa do VE} = 0.8 \times (1.04 \times ([\text{SIV} + \text{DDFVE} + \text{PPVE}]^3 - [\text{DDFVE}]^3)) + 0,6$$

Em humanos existem diversas formas de se indexar o valor da massa para as características do indivíduo, como a correção para a superfície corporal e a altura, e a utilização de referências, de acordo com o sexo e a raça. No entanto, ainda existe controvérsia na literatura em relação ao melhor índice a ser considerado em diferentes cenários clínicos(28). Em indivíduos obesos, por exemplo, a indexação para a superfície corporal pode subestimar o grau de

hipertrofia ventricular, sendo preferível a indexação pela altura. Por outro lado, em indivíduos idosos, que habitualmente apresentam redução da altura com a idade, pelo processo de degeneração dos discos vertebrais, a indexação para a altura pode superestimar a hipertrofia(29). Em hamsters, essas alterações ainda não foram estudadas.

Figura 1: Modo M do ventrículo esquerdo na janela paraesternal longitudinal em hamster. (1) **SIV**- septo interventricular; (2) **DDFVE**- diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; (3) **PPVE**- parede posterior do ventrículo esquerdo; (4) **DSFVE**- diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo.

1.2 Métodos convencionais de avaliação da função sistólica do ventrículo esquerdo pela ecocardiografia

Dentre os índices de estimativa da função sistólica do VE destacam-se o cálculo da fração de encurtamento e da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), estes, historicamente, mais utilizados em modelos experimentais animais.

1.2.1 Fração de encurtamento

A fração de encurtamento utiliza duas medidas lineares (DDFVE e DSFVE) para estimar a função sistólica do VE. Como se baseia apenas em medidas lineares, não deve ser utilizada na presença de alterações da geometria e mobilidade segmentar do VE(33). É expressa em porcentagem e calculada pela fórmula abaixo:

$$\text{Fração de encurtamento} = (\text{DDFVE} - \text{DSFVE}) \times 100 / \text{DDFVE}$$

1.2.2 Fração de ejeção do ventrículo esquerdo

A FEVE é o percentual do volume sanguíneo ejetado pelo VE em relação ao seu volume máximo, que corresponde ao volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE). Em pacientes que não apresentem comunicação intraventricular ou regurgitação mitral significativas o volume ejetado é a diferença entre o VDFVE e o volume sistólico final do ventrículo esquerdo (VSFVE). Assim, é possível calcular a FEVE da seguinte forma:

$$\text{FEVE} = \frac{\text{Volume ejetado}}{\text{VDFVE}} = \frac{\text{VDFVE} - \text{VSFVE}}{\text{VDFVE}}$$

A estimativa dos volumes ventriculares pode ser obtida pelo modo M do VE na janela paraesternal longitudinal (Figura 1). A partir da mensuração do DDFVE e do DSFVE e, levando-se em consideração presunções geométricas, são obtidos o VDFVE e o VSFVE. A fórmula de Teichholz(35,36) estima o volume (Vol) a partir do diâmetro (D), conforme descrito abaixo:

$$\text{Vol} = (7/2,4 D) \times D^3$$

No entanto, tal análise pode ser prejudicada em indivíduos que apresentem variações, tanto na mobilidade segmentar quanto na geometria do VE(36); tornando-se um método menos confiável para a análise de indivíduos cardiopatas, especialmente nas patologias com envolvimento segmentar, como a

miocardiopatia chagásica e a isquêmica. Em tais situações, é preferível a utilização de métodos que estimem o volume a partir de medidas ventriculares bidimensionais que permitam o contorno das bordas do endocárdio, como o método de Simpson (método de somação dos cilindros); que viabiliza a estimativa da FEVE com maior acurácia(37). Nele, as bordas do endocárdio são definidas pelo examinador contornando manualmente a interface entre o sangue e o endocárdio nas projeções apicais em quatro e duas câmaras, delimitando a cavidade ventricular esquerda em diástole e sístole. Um programa de computador incorporado ao aparelho é capaz de dividir as cavidades em vários cilindros de alturas iguais; determinando o volume de cada cilindro em diástole e sístole. O volume total da cavidade é obtido pela média aritmética dos volumes individuais de cada cilindro (Figura 2). Tal método não pode ser utilizado quando a diferença do comprimento da cavidade ventricular esquerda for superior a 20% em cada projeção(38).

Figura 2: Cálculo dos volumes do ventrículo esquerdo em humanos pelo método de Simpson biplanar. Definição manual das bordas do endocárdio (setas amarelas) em diástole nas projeções apicais em quatro câmaras **(A)** e duas câmaras **(B)**, obtendo-se a fração de ejeção do ventrículo esquerdo em cada projeção **(setas brancas)** e pelo método biplanar **(seta vermelha)**.

De forma alternativa, em situações em que apenas uma projeção pode ser obtida, ou quando a diferença do comprimento das cavidades entre as projeções

de quatro câmaras e duas câmaras é superior a 20%, o volume pode ser estimado pelo método de área comprimento(38). Esse método, inicialmente descrito para o cálculo do volume pela técnica de ventriculografia (39), utiliza a área planimetrada (A) e o comprimento longitudinal do VE (L) como bases para o cálculo do volume (Vol), segundo a fórmula a seguir:

$$\text{Vol} = 5.A^2/L$$

Em humanos, utiliza-se a projeção paraesternal em eixo curto (EC) para a estimativa da área e projeção apical para a estimativa do L do VE(33). Entretanto, em roedores, utiliza-se apenas a janela paraesternal eixo longo (EL) para as estimativas da área e do comprimento (Figura 3), dada a limitada qualidade técnica das imagens obtidas na janela apical(20,22).

Figura 3: Cálculo dos volumes do ventrículo esquerdo em hamster pelo método de Área comprimento. **(A)** Imagem em diástole; **(B)** Imagem em sístole. O contorno do endocárdio em diástole (linha externa vermelha) e em sístole (linha externa verde) são definidos pelo examinador com a determinação dos volumes (setas brancas) e da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (seta vermelha).

A FEVE possui valor prognóstico em diferentes situações, tanto clínicas quanto experimentais animais(40-44). Em humanos, possui menor capacidade

discriminativa quando acima de 45%. Mas, a presença de outras informações clínicas aumenta o risco cardiovascular de forma independente da FEVE. Por exemplo, um paciente diabético com FEVE de 40% possui risco equivalente ao de outro não diabético com FEVE de 25%(45). Também se deve ter em mente que a FEVE é dependente de situações de pré e pós-carga, da FC e possui reprodutibilidade variável. Dessa forma, a avaliação da função sistólica do VE deve ser realizada por meio de diversos parâmetros e interpretada levando-se em consideração o maior número possível de informações clínicas(46). Basicamente, a FEVE avalia a variação de volume que ocorre durante o ciclo cardíaco. No entanto, essa variação é apenas o produto final de outras alterações na mecânica cardíaca que ocorrem em nível celular. Durante a sístole, o encurtamento das fibras do endocárdio e epicárdio (que estão dispostas no sentido longitudinal) levam à redução do comprimento longitudinal do coração (sentido base-ápice). Por sua vez, o encurtamento das fibras mesocárdicas (dispostas no sentido circunferencial), leva ao espessamento no sentido radial(47). Contudo, em estágios iniciais de algumas patologias ocorre redução da função das fibras dispostas longitudinalmente, com compensação de aumento da função das fibras dispostas circunferencialmente. Assim, a FEVE pode permanecer inalterada mesmo na presença de disfunção miocárdica incipiente(48-52). Uma das formas de se caracterizar essas variações na mecânica cardíaca é pela análise da deformação miocárdica.

1.3 Utilização da técnica de rastreamento de pontos para a avaliação da deformação miocárdica e da fração de ejeção do ventrículo esquerdo pela ecocardiografia

1.3.1 Análise da deformação miocárdica

Deformação é a mudança de forma apresentada por um objeto. A avaliação da deformação miocárdica pela ecocardiografia foi, inicialmente, descrita por Quiñones et al. (1974)(53) com a utilização do modo M, sendo este um método pouco sensível para tal análise.

Novos estudos avaliaram a deformação pelo Doppler tecidual, examinando a velocidade do tecido miocárdico em relação ao transdutor. Porém, tal técnica é demorada e possui limitações inerentes ao método, como a elevada dependência de angulação do tecido em relação ao transdutor, incapacidade de diferenciar os movimentos passivo e ativo do músculo cardíaco e limitação de analisar o movimento do músculo em apenas um sentido em cada projeção(54-56).

Nos últimos anos ocorreu grande desenvolvimento na análise pelo método de rastreamento de pontos ou *speckle tracking*. Essa análise se faz por meio de imagens bidimensionais e só é possível pela formação de padrões de pontos brilhantes (*speckles*), devida ao fenômeno de reflexão das ondas de ultrassom com as diversas interfaces do músculo cardíaco. Um programa de computador específico é capaz de identificar e acompanhar inúmeros *speckles* a cada quadro, possibilitando o rastreamento destes ao longo do ciclo cardíaco. As principais vantagens dessa análise em comparação à realizada pelo Doppler tecidual são: capacidade de analisar a deformação em dois sentidos (bidimensionalmente) para cada projeção, influência reduzida da angulação do tecido em relação ao transdutor, menor influência dos movimentos passivos do músculo cardíaco e maior reprodutibilidade(57-61).

A análise da deformação miocárdica pelo método de rastreamento de pontos possibilita a detecção de alterações subclínicas com alta sensibilidade (62-67), além de agregar informação prognóstica, mesmo em pacientes com FEVE normal(62,63).

O método de rastreamento de pontos já foi validado utilizando-se, tanto a ressonância magnética cardíaca e a sonomicrometria como os métodos de

referência(58,68) e está sendo incorporado cada vez mais a estudos experimentais animais, na prática clínica e nas recomendações das sociedades de ecocardiografia(33,57,65,66,69).

1.3.2 Avaliação da fração de ejeção do ventrículo

Além de permitir a análise da deformação miocárdica, o método de rastreamento de pontos também possibilita a estimativa dos volumes ventriculares e, conseqüentemente, da FEVE (Figura 4). Nesse método, o examinador determina as bordas do endocárdio em um único quadro, utilizando algumas marcações como referência. A seguir, um programa de computador identifica os pontos correspondentes ao endocárdio e os rastreia nos quadros subsequentes. Assim, são obtidos os limites da cavidade ventricular esquerda em diástole e sístole, que são transformados em VDFVE e VSFVE. Esta é a forma utilizada para o cálculo da FEVE pelo método de rastreamento de pontos em roedores(25). Em humanos, atualmente alguns dos programas de computador são capazes de realizar todo o processo acima de forma automatizada, sem a necessidade de marcação das bordas do endocárdio pelo examinador(25,60,70).

Figura 4: Cálculo dos volumes em hamster pela técnica de rastreamento de pontos. **(A)** Imagem em diástole. **(B)** Imagem em sístole. **(C)** Curvas de volume. Pelo rastreamento dos pontos do endocárdio (tracejado em verde- A e B) obtém-se a curva do volume ao longo do ciclo cardíaco (linha laranja- C) e a curva da relação do volume pelo tempo (curva azul- C).

1.3.3 Definições

Alguns conceitos precisam ser solidificados para melhor compreensão dos termos utilizados quando se estuda a mecânica cardíaca(57,69).

- Deslocamento: define a distância que uma estrutura percorre entre quadros consecutivos, sendo expressa em centímetros (cm);

- Velocidade: corresponde ao deslocamento por unidade de tempo, expressa em cm/s;
- Deformação (*strain*): como já citado, descreve a mudança de forma que um objeto a partir de uma condição inicial pré-estabelecida, ou seja, o percentual de mudança do comprimento de um segmento miocárdico. Por convenção, quando o comprimento final é maior que o inicial (alongamento ou espessamento) se escreve com sinal positivo (exemplo: +20%). Caso contrário (encurtamento ou adelgaçamento) se escreve com sinal negativo (exemplo: -20%);
- Deformação global: é obtida pela média da deformação dos diferentes segmentos daquele eixo. O método de rastreamento de pontos bidimensional permite avaliar a deformação longitudinal (S_l) global, a deformação radial (S_r) global e a deformação circunferencial (S_c) global. Além disso, em alguns, a deformação em cada eixo pode ser mensurada individualmente em cada camada miocárdica: endocárdica, mesocárdica e epicárdica(71,72);
- Deformação regional corresponde ao estudo da deformação em determinado segmento do VE (exemplo: S_r do segmento anterior basal);
- Deformação territorial: corresponde à deformação em cada um dos territórios teóricos de irrigação vascular. É pouco utilizada na prática clínica;
- Taxa de deformação (*strain rate*): trata-se da velocidade com que ocorre a deformação. É expressa em 1/s ou s^{-1} ;
- Rotação: termo utilizado para expressar o deslocamento rotacional que ocorre sob o EL cardíaco. Costumeiramente, o ápice e a base do VE se deslocam em sentidos opostos. A base roda em sentido horário na sístole e em sentido inverso na diástole. Por convenção, a rotação anti-horária se inscreve com sinal positivo e a horária com sinal negativo;
- *Twist*: é a diferença da rotação entre a base e o ápice do VE. Assim como a rotação, é expressa em graus;

- Torção: corresponde ao *twist* dividido pelo L do VE e sua unidade é graus por centímetro.

1.3.4 Deformação langrangiana e deformação natural

Um objeto pode sofrer uma deformação do tipo langrangiana (ϵ) ou do tipo natural (ϵ'). A primeira ocorre quando a rigidez do objeto é constante, independentemente do esforço aplicado sobre o mesmo; o que se observa em materiais elásticos. No entanto, tecidos biológicos, como o miocárdio, apresentam rigidez variável, que aumenta de forma linear com o aumento do esforço. Assim, à partir do comprimento final (L1) e do comprimento inicial (L0), têm-se as fórmulas para o cálculo da ϵ e da ϵ' :

$$\epsilon = L1 - L0 / L0$$

$$\epsilon' = \ln (L1 / L0)$$

onde $\ln$ = logaritmo natural.

Os programas de computador utilizados para análise da deformação miocárdica pelo método de rastreamento de pontos, habitualmente calculam a ϵ . Por sua vez, quando a análise é realizada pelo Doppler tecidual, normalmente expressam a ϵ' . Felizmente, esses tipos de deformação se correlacionam e matematicamente podem ser transformadas uma na outra(69). É importante o conhecimento dessa diferença, pois os valores da deformação utilizando a técnica de rastreamento de pontos são distintos dos valores obtidos utilizando o Doppler tecidual.

1.3.5 Aspectos técnicos

A deformação miocárdica ocorre de forma contínua e cíclica, sendo que o tecido cardíaco jamais permanece em estado de repouso absoluto. O final da diástole é definido pelo momento de fechamento da valva mitral. O pico da onda R no eletrocardiograma pode ser utilizado como marcador de tal evento. Por sua

vez, o final da sístole pode ser demarcado pelo fechamento da valva aórtica ao Doppler, pelo nadir da deformação global, ou ainda pelo mínimo volume ventricular(69). A definição do final da sístole é essencial em mensurações de função sistólica como a deformidade sistólica, sendo o fechamento de valva aórtica o mais confiável marcador dentre os citados(73). Assim, os seguintes parâmetros podem ser obtidos: deformação de pico sistólico (deformação máxima que ocorre na sístole), deformação ao final da sístole (valor da deformação no exato momento de fechamento da valva aórtica) e deformação máxima (deformação máxima que ocorre durante todo ciclo cardíaco, levando-se em consideração tanto a sístole quanto a diástole)(69).

Como já citado, as imagens obtidas pela janela apical em roedores possuem qualidade técnica limitada(20,22). Dessa forma, utiliza-se a janela paraesternal em EL e EC para avaliar a deformação nos três eixos: longitudinal, radial e circunferencial(23,74) (Figura 5).

Figura 5: Representação do ventrículo esquerdo em hamsters nos cortes paraesternal eixo longo e paraesternal eixo curto. As setas em vermelho indicam a deformação no sentido longitudinal; as setas em azul, no sentido circunferencial e as setas em amarelo, no sentido radial. 1) inferior basal; 2) inferior médio; 3) ínfero apical; 4) anterior basal; 5) anterior médio; 6) septo apical; 7) anterior; 8) ântero lateral; 9) ínfero lateral; 10) inferior; 11) septo inferior; 12) septo anterior.

A deformação miocárdica nos eixos longitudinal e circunferencial inscreve-se com valores negativos, já que nesses planos o L1 é menor que o L0. Por outro lado, no eixo radial a deformação inscreve-se em valores positivos, já que neste plano o L1 é maior que o L0. Em roedores, utiliza-se um padrão de avaliação de seis segmentos na projeção paraesternal longitudinal: anterior basal (AB), anterior médio (AM), ântero apical (AA), inferior basal (IB), inferior médio (IM) e ínfero apical (IA); e seis segmentos na projeção paraesternal em EC: anterior (Ant), ântero lateral (AL), ínfero lateral (IL), inferior (Inf), septo inferior (SI) e septo anterior (SAnt)(20,61,75,76) (Figura 5).

Apesar de alguns estudos já indicarem intervalos de referência (IR) para a deformação segmentar em humanos, as diretrizes ainda não incorporaram tais recomendações(33,59,77), sendo que a deformação global ainda é a mais utilizada. Não obstante estudos emergentes utilizando a análise da deformação miocárdica bidimensional pela técnica de rastreamento de pontos em diversos animais, incluindo outros roedores (20, 78-83), ainda não foram definidos os IR a serem utilizados para hamsters sírios. Isso limita o estudo de alterações cardíacas incipientes neste importante modelo experimental animal.

2- Objetivos

2.1 Objetivo geral

Analisar parâmetros de ecocardiografia convencional e de deformidade miocárdica derivados da técnica de rastreamento de pontos referentes à estrutura e função do VE em hamsters sírios adultos saudáveis.

2.2 Objetivos específicos

Em hamsters sírios adultos saudáveis (12 semanas):

- 1- Definir a exequibilidade da obtenção do modo M do VE e da FEVE, utilizando o método de área comprimento;
- 2- Definir a exequibilidade da obtenção dos seguintes parâmetros derivados do método de rastreamento de pontos: FEVE, análise da deformação global e segmentar para as projeções paraesternal EL e paraesternal EC;
- 3- Definir IR para as seguintes variáveis ecocardiográficas: DDFVE, DDFVE/peso, DSFVE, DSFVE/peso, Massa do VE, Massa do VE/peso, Fração de encurtamento, FEVE utilizando os métodos de rastreamento de pontos, de área comprimento e de rastreamento de pontos, S_l endocárdica, S_c endocárdica, S_r endocárdica;
- 4- Avaliar a correlação entre a FEVE obtida pelos três métodos de estimativas de volume: métodos de Teichholz, de área comprimento e de rastreamento de pontos;
- 5- Verificar a relação da FC e do peso com os seguintes parâmetros: DDFVE, DSFVE, Massa do VE, Fração de encurtamento, FEVE utilizando os métodos de rastreamento de pontos, de área

comprimento e de rastreamento de pontos, S_l endocárdica, S_c endocárdica, S_r endocárdica;

- 6- Avaliar a variabilidade intraobservador e interobservador dos seguintes parâmetros: DDFVE, DSFVE, Massa do VE, Fração de encurtamento, FEVE utilizando os métodos de rastreamento de pontos, de área comprimento e de rastreamento de pontos, S_l endocárdica, S_c endocárdica, S_r endocárdica.

3. Material e Métodos

3.1 Caracterização da amostra e aspectos éticos

Foram utilizados hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) adultos fêmeas de 12 semanas de idade (Anilab - Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda, Paulínia/SP, Brasil). O projeto foi desenvolvido de acordo com as recomendações internacionais em experimentação animal(87) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) (Anexo A). Os animais foram acondicionados no Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, submetidos a ritmo de 12 horas de luz/sombra, com livre acesso à água e ração.

Foram definidos como critérios de exclusão do estudo:

- a) incapacidade de sedação adequada com a dose de anestésico preconizada;
- b) evidências clínicas de patologias extracardíacas nos animais estudados;
- c) presença de arritmias cardíacas como bigeminismo, taquicardias ventriculares e supraventriculares durante o estudo ecocardiográfico;
- d) presença de alterações no ecocardiograma tais como alterações da mobilidade segmentar do VE, defeitos congênitos, etc.

3.2 Ecocardiografia - aquisição das imagens

Foi utilizado sistema de ultrassom comercialmente disponível e dedicado para estudo experimental animal: Vevo[®] 2100 (VisualSonics Inc, Toronto, Canadá) e transdutor linear de 30 MHz de frequência fundamental (Figura 6). As imagens foram adquiridas por um único examinador habilitado em ecocardiografia clínica, com dois anos de treinamento reconhecidos pela Sociedade Brasileira de Cardiologia e com experiência na realização de ecocardiograma em roedores.

Figura 6: Equipamentos utilizados para a realização do exame ecocardiográfico: **(A)** Vevo® 2100; **(B)** transdutor linear de 30 MHz.

Após quantificação do peso e sedação com ketamina/xilazina intramuscular (100mg/kg e 10mg/kg respectivamente), foi realizada tricotomia da porção anterior do tórax com creme depilatório comercialmente disponível. Os animais foram posicionados sobre uma plataforma inclinável (VisualSonics Inc, Toronto, Canadá) com controle de temperatura para evitar hipotermia. A seguir, monitorização com eletrocardiograma de superfície, mantida durante toda a realização do exame (Figura 7). Os animais foram mantidos em ventilação espontânea.

Figura 7: Equipamentos utilizados: **(A)** Mesa com superfície aquecida e inclinável.

Gel aquecido era aplicado sobre ao transdutor e este manualmente posicionado no tórax, com o cuidado de não realizar pressão excessiva, para se evitar a indução de bradicardia. Eram realizados ajustes em parâmetros como profundidade, foco e ganho com o objetivo de se obterem imagens com melhor qualidade e maior taxa de quadros por segundo (qps) possível para cada uma das

projeções. As sequências de vídeos foram adquiridas com ao menos três ciclos cardíacos nas seguintes projeções: (1) paraesternal EL e (2) paraesternal EC em nível de músculos papilares (Figura 8). Adquirida imagem estática em modo M, guiado pela imagem bidimensional na janela paraesternal em EL, obtida perpendicularmente às paredes do VE, conforme diretriz de quantificações cavitárias da Sociedade Americana de Ecocardiografia e da Sociedade Europeia de Imagem Cardiovascular(33).

Figura 8: Exemplos de imagens bidimensionais em hamsters. **(A)** Imagem paraesternal em eixo longo. **(B)** Imagem paraesternal em eixo curto. VD- ventrículo direito; VE- ventrículo esquerdo; AE- átrio esquerdo.

3.3 Medidas de ecocardiografia convencional de geometria e função ventricular

Realizadas em estação de trabalho Vevo[®] Lab (VisualSonics Inc, Toronto, Canadá). Para as medidas obtidas pelo modo M foram selecionadas as imagens mais representativas do ciclo cardíaco e sem interferência de movimentos

respiratórios. Também foram obtidas medidas do septo interventricular, do DDFVE, da PPVE e do DSFVE (Figura 1). Para o cálculo da FEVE pelo modo bidimensional foi selecionado o vídeo melhor representativo da projeção paraesternal longitudinal e com melhor definição das bordas do endocárdio. A seguir, era selecionado o quadro com o maior volume diastólico seguido da marcação das bordas do endocárdio em diástole. No mesmo ciclo cardíaco era escolhido o quadro com menor volume sistólico e realizada a marcação das bordas do endocárdio em sístole (Figura 3).

3.4 Análise pela técnica de rastreamento de pontos

As imagens foram analisadas utilizando-se estação de trabalho comercialmente disponível Vevo[®] Strain (VisualSonics Inc, Toronto, Canadá), conforme recomendações do fabricante, e baseado em protocolo descrito previamente para camundongos(75). Tal equipamento, dedicado para o estudo experimental animal, permite a análise da deformação miocárdica bidimensional pelo método de rastreamento de pontos das camadas endocárdica e epicárdica nas janelas paraesternal EL e paraesternal EC (em nível de músculos papilares). Para cada animal e cada projeção foi selecionado o ciclo cardíaco mais representativo, levando-se em consideração os seguintes fatores: melhor visualização dos segmentos ventriculares, ausência de artefatos respiratórios e maior taxa de quadros disponível(74). O início da sístole foi definido como o pico da onda R do eletrocardiograma de superfície e, o final, como o momento de menor dimensão da cavidade ventricular esquerda. Para delimitar as bordas do endocárdio foram distribuídos manualmente pelo observador e de forma sequencial 8 a 12 pontos de marcação ao longo da cavidade ventricular esquerda (nos sentidos basal-apical-basal no EL e anterior-lateral-inferior-septal-anterior no EC). Os músculos papilares foram excluídos do traçado do endocárdio. Quando o primeiro quadro não permitia a correta visualização dos segmentos, era selecionado um quadro subsequente que apresentasse melhor visualização. Posteriormente, foi selecionada a opção de traçado do epicárdio, ajustando a

distância deste em relação ao endocárdio, de acordo com a espessura do miocárdio, evitando-se atingir o sinal mais refringente representativo do pericárdio. A análise da deformação miocárdica foi executada em painel específico e o traçado gerado pelo programa, assim como o rastreamento de pontos foi conferido por análise visual do ecocardiografista (Figura 9). Em caso de traçado e/ou rastreamento inadequado, era realizada nova tentativa.

Figura 9: Análise da deformação miocárdica em hamsters. Conferência do traçado endocárdico (contorno branco) e epicárdio (contorno verde) nos eixos longo (A) e curto (B).

Após a otimização do traçado, foram obtidos os valores de deformação sistólica de pico para cada um dos segmentos em cada uma das projeções (Figuras 10 e 11) nas camadas endocárdica e epicárdica. As imagens armazenadas foram submetidas à avaliação intraobservador e interobservador três meses após a avaliação inicial. A análise interobservador seguiu o mesmo protocolo descrito acima e realizada por um segundo examinador, também habilitado em ecocardiografia clínica, com dois anos de treinamento reconhecidos pela Sociedade Brasileira de Cardiologia e com experiência na realização de ecocardiograma em roedores.

Figura 10: Análise da deformação endocárdica global e segmentar na janela paraesternal eixo longo em hamsters. **(A)** Curvas de deformação longitudinal; **(B)** Valores de deformação longitudinal. São representados os valores de deformação endocárdica global (linhas brancas) e para cada um dos segmentos do ventrículo esquerdo. 1) inferior basal; 2) inferior médio; 3) ínfero apical; 4) anterior basal; 5) anterior médio; 6) ântero apical.

Figura 11: Análise da deformação endocárdica global e segmentar na janela paraesternal eixo curto em hamsters. **(A)** Curvas de deformação radial. **(B)** Valores de deformação radial. **(C)** Curvas de deformação circunferencial. **(D)** Valores de deformação circunferencial. São representados os valores de deformação endocárdica global (linhas brancas) e para cada um dos segmentos do ventrículo esquerdo. 1) Anterior; 2) Ântero lateral; 3) Ífero lateral; 4) Inferior; 5) Septo inferior; 6) Septo anterior.

3.5 Análise da exequibilidade

Para cada uma das variáveis estudadas foi avaliada a exequibilidade da realização das medidas. Para os parâmetros de ecocardiografia convencional foram consideradas exequíveis as imagens com boa qualidade técnica, correta identificação das estruturas e que permitissem a realização adequada das medidas. Desta forma, a exequibilidade dos parâmetros dependentes do modo M

(DDFVE, DSFVE, massa do VE, fração de encurtamento e FEVE pelo método de Teichholz) foi descrita como “exequibilidade do modo M do ventrículo esquerdo”. Para as variáveis derivadas do método de rastreamento de pontos foram considerados exequíveis os segmentos que apresentaram rastreamento adequado durante um ciclo cardíaco. Assim, quando a análise da deformação de um segmento foi exequível no EC, também foi exequível a análise da S_r e S_c desse segmento. A deformação global em cada projeção foi considerada exequível quando ao menos cinco dos seis segmentos foram adequadamente rastreados. O valor da deformação global foi estabelecido como a média da deformação dos segmentos exequíveis, de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia e da Sociedade Europeia de Imagem Cardiovascular para a padronização e realização de medidas de deformação miocárdica pelo método de rastreamento de pontos(69).

3.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Patologia Veterinária para a determinação de valores de referências para espécies animais(84). A distribuição normal dos dados foi avaliada por histogramas e testada pelo método de Shapiro-Wilk. Parâmetros contínuos foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP), se distribuição normal, ou como mediana(intervalo interquartil - IIQ), se não distribuídos como normal.

Para testar a diferença entre médias de dois grupos, foi empregado o teste t de Student para variáveis com distribuição normal, e o teste de Mann-Witney para variáveis com distribuição não normal.

O IR 95% das variáveis ecocardiográficas foi determinado utilizando-se métodos não paramétricos quando $n \geq 120$ e pelo método robusto de Horn quando $80 \leq n < 120$ (84-86).

O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a relação entre as variáveis com distribuição normal e o teste de Spearman para variáveis que não seguiram uma distribuição normal.

Para a análise comparativa entre três ou mais grupos simultaneamente foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA) para variáveis com distribuição normal.

A variabilidade intraobservador e interobservador foi realizada três meses após a análise inicial por meio de análise de Bland-Altman, do coeficiente de variação (CV) e do coeficiente de correlação intraclass (CCI). Foram selecionados, de forma aleatória, 20 animais com imagens adequadas para a análise dos dados. As avaliações foram cegas em relação aos resultados obtidos previamente.

A análise de regressão linear foi utilizada para verificar a interferência do peso e da FC nos valores obtidos dos parâmetros de geometria e função do VE e para os parâmetros de deformação endocárdica global. O nível de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os programas de computador STATA 14 (StataCorp, USA) e MedCalc versão 15.0 (MedCalc Software, Bélgica).

4. Resultados

Foram incluídos no estudo 135 hamsters sírios. Ocorreram três óbitos na indução anestésica, antes do início do ecocardiograma. Um animal foi excluído pela evidência clínica de patologia (presença de deformidade torácica), dois pela presença de arritmias (um devido ao bigeminismo e outro à taquiarritmia supraventricular) e três por alterações da mobilidade segmentar do VE (dois animais com hipocinesia apical e um animal com hipocinesia difusa), totalizando 126 roedores, nos quais a ecocardiografia foi aplicada (Figura 12).

Figura 12: Fluxograma ilustrando a população de animais do estudo.

Os animais apresentaram idade de 89(87-90) dias e peso de $137,4 \pm 12,8$ g. Nas imagens de EL, a FC foi de 204 ± 23 batimentos por minuto (bpm) e a taxa de quadros utilizada foi de 186(168-196) qps e no EC, a FC foi de $197,5 \pm 24,1$ bpm e a taxa de quadros utilizada foi de 213(182-259) qps (Tabela 1). A FC média no EL

foi maior que a obtida no EC ($p < 0,0001$). Por outro lado, a taxa de quadros nas imagens de EC foi superior à do EL ($p < 0,0001$).

Tabela 1 - Características da amostra

	(n = 126)			
	Média ou mediana	DP ou IIQ	Mínimo	Máximo
Idade (dias)	89	(87-90)	84	96
Peso (g)	137,4	± 12,8	112	167
Imagens de Eixo longo				
Frequência cardíaca (bpm)	204,0	± 23,0	156	256
Taxa de quadros (qps)	186	(168-196)	158	259
Imagens de Eixo curto				
Frequência cardíaca (bpm)	197,5	± 24,1	142	259
Taxa de quadros (qps)	213	(182-259)	158	289

DP= desvio padrão; **IIQ**= intervalo interquartil; **g**= gramas; **bpm**= batimentos por minuto; **qps**= quadros por segundo.

4.1 Avaliação da exequibilidade

Os dados referentes à exequibilidade de parâmetros ecocardiográficos de geometria e função ventricular esquerda, da deformação miocárdica no EL e no EC estão apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4, respectivamente. Todos os métodos avaliados para o cálculo da FEVE apresentaram exequibilidade superior a 84% (Tabela 2).

Tabela 2 - Exequibilidade de parâmetros ecocardiográficos de geometria e função ventricular esquerda em hamsters

Parâmetro	(n = 126)	
	Análise exequível (n)	Exequibilidade (%)
Exequibilidade do modo M do ventrículo esquerdo	120	95
FEVE Área comprimento	118	93
FEVE Rastreamento de pontos	107	84

n= número; **FEVE**= fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

A avaliação da deformação endocárdica global e segmentar no EL apresentou boa exequibilidade, sendo que os segmentos IA e AA foram os menos exequíveis (84%). Por outro lado, a análise da deformação epicárdica global foi exequível em apenas 42% dos casos e, dentre os segmentos analisados, apenas o segmento IM apresentou exequibilidade superior a 80% (Tabela 3 e Gráfico 1). De forma similar, no EC, a exequibilidade da análise da deformação endocárdica foi superior à da epicárdica: 80% e 60%, respectivamente. A análise da deformação endocárdica foi mais exequível para os segmentos anterior e inferior (Tabela 4 e Gráfico 2).

Tabela 3 - Exequibilidade da deformação miocárdica no eixo longo em hamsters

	(n = 126)	
	Análise exequível (n)	Exequibilidade (%)
Endocárdica		
Global	107	84
Inferior basal	115	91
Inferior médio	115	91
Ífero apical	107	84
Anterior basal	120	95
Anterior médio	124	98
Ântero apical	107	84
Epicárdica		
Global	54	42
Inferior basal	83	65
Inferior médio	104	82
Ífero apical	80	63
Anterior basal	90	71
Anterior médio	100	79
Ântero apical	77	61

n= número.

Gráfico 1: Representação gráfica da exequibilidade da deformação no eixo longo por camada e por segmento em hamsters.

Gráfico 2: Representação gráfica da exequibilidade da deformação no eixo curto por camada e por segmento em hamsters.

Tabela 4 - Exequibilidade da deformação miocárdica no eixo curto em hamsters

(n = 126)		
	Análise executável (n)	Exequibilidade (%)
Endocárdica		
Global	101	80
Anterior	116	92
Ântero lateral	108	85
Ífero lateral	108	85
Inferior	112	88
Septo inferior	105	83
Septo anterior	110	87
Epicárdica		
Global	79	62
Anterior	114	90
Ântero lateral	93	73
Ífero lateral	105	83
Inferior	104	82
Septo inferior	66	52
Septo anterior	96	76

n- número.

4.2 Definição de intervalos de referência

Os histogramas de frequências da FEVE obtida pelos três métodos estão apresentados nos Gráficos 3, 4 e 5. Tais variáveis apresentam distribuição normal ($p=0,504$ para o método de Teichholz; $p=0,311$ para o método de área comprimento e $p=0,635$ para o método de rastreamento de pontos).

Gráfico 3: Histograma de frequências do cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) pelo método de Teichholz para quantificação de volume.

Gráfico 4: Histograma de frequências do cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) pelo método de área comprimento para quantificação de volume.

Gráfico 5: Histograma de frequências do cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) pelo método de rastreamento de pontos para quantificação de volume.

Os IR 95% para as variáveis de geometria e função do VE estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Intervalos de referência para variáveis ecocardiográficas de geometria e função ventricular esquerda em hamsters

	Média/DP ou mediana/IQ	IR 95%
DDFVE (mm)	6,5(6,2-6,8)	[5,7; 7,4]
DDFVE/peso (mm/hg)	4,7±0,4	[3,6; 5,9]
DSFVE (mm)	4,4±0,4	[3,6; 5,2]
DSFVE/peso (mm/hg)	3,2±0,3	[2,2; 4,2]
Massa do VE (mg)	263±46	[171; 357]
Massa do VE/peso (mm/hg)	194±32	[109; 279]
Fração de encurtamento	32,7±4,1	[21,5; 43,5]
FEVE Teichholz (%)	59,0±5,8	[47,4; 70,8]
FEVE Área comprimento (%)	53,8±4,7	[44,3; 63,1]
FEVE Rastreamento de pontos (%)	46,3±5,7	[34,4; 57,6]

DP- desvio padrão; **IQ-** intervalo interquartil; **IR-** intervalo de referência; **DDFVE-** diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; **DSFVE-** diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo; **VE-** ventrículo esquerdo; **FEVE-** fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

Foram encontrados valores estatisticamente diferentes para o cálculo da FEVE entre os diferentes métodos avaliados ($p < 0,0001$) (Gráfico 6). Os valores da FEVE, determinados pelo método de rastreamento de pontos, foram menores do que os obtidos quando utilizados os métodos de Teichholz e de área comprimento. As correlações positivas entre os valores da FEVE, obtidos pelos métodos de Teichholz e de área comprimento ($r = +0,28$; $p = 0,0025$), ou entre os métodos de Teichholz e de rastreamento de pontos ($r = +0,31$; $p = 0,0032$) foram fracas. Verificou-se razoável correlação positiva da FEVE, obtida pelos métodos de área comprimento e de rastreamento de pontos ($r = +0,43$; $p < 0,0001$) (Gráfico 7).

Gráfico 6: Fração de ejeção do ventrículo esquerdo, obtida por diferentes métodos de quantificação de volume em hamsters. **(A)** Teichholz; **(B)** Área comprimento; **(C)** Rastreamento de pontos.

Gráfico 7: Gráfico de dispersão e correlação de Pearson (r) entre as medidas da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) quando realizada a quantificação do volume pelo métodos de área comprimento e de rastreamento de pontos em hamsters.

Foram definidos os IR para as variáveis de deformação de pico sistólico global do endocárdio, conforme demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 - Intervalos de referência da deformação global endocárdica em hamsters

	Média/Mediana e DP/IQ	IR 95%
S _l	-13,6(-7,5; -20,4)	[-7,9; -19,2]
S _c	-20,5±3,1	[-14,3; -26,7]
S _r	34,7±7,0	[+21,0; +49,4]

DP= desvio padrão; **IQ=** intervalo interquartil; **IR=** intervalo de referência; **S_l=** deformação longitudinal global; **S_c=** deformação circunferencial global; **S_r=** deformação radial global.

Os IR para os índices de deformação epicárdica estão descritos no Apêndice A. Os IR para os índices de deformação segmentar por projeção estão apresentados nos Apêndices B, C e D. Os resultados da análise de regressão linear para os parâmetros de geometria e função do VE estão demonstrados na Tabela 7. O valor da FC apresentou correlação com os resultados do DDFVE ($p=0,0221$), do DSFVE ($p=0,0003$), da fração de encurtamento ($p=0,0016$) e da FEVE, obtida pelos três diferentes métodos de estimativas de volumes ($p=0,0017$ -Teichholz; $p=0,0013$ - área comprimento e $p<0,0001$ - rastreamento de pontos). Por sua vez, o peso influenciou as medidas do DDFVE, do DSFVE e da massa do VE ($p=0,0001$; $p=0,0038$ e $p<0,0001$, respectivamente).

Tabela 7 - Análise de regressão linear para os parâmetros de geometria e função do ventrículo esquerdo em hamsters

	Coeficiente Beta	EP	R ²	p
DDFVE (mm)				
Peso (g)	0,011	0,002	0,128	0,0001
Frequência cardíaca (bpm)	0,003	0,001	0,043	0,0221
DSFVE (mm)				
Peso (g)	0,008	0,002	0,068	0,0038
Frequência cardíaca (bpm)	0,006	0,001	0,103	0,0003
Massa do VE (mg)				
Peso (g)	1,470	0,314	0,156	<0,0001
Frequência cardíaca (bpm)	0,252	0,194	0,014	0,1971
Fração de encurtamento (%)				
Peso (g)	-0,012	0,029	0,001	0,6810
Frequência cardíaca (bpm)	-0,052	0,016	0,081	0,0016
FEVE Teichholz (%)				
Peso (g)	-0,023	0,041	0,002	0,5693
Frequência cardíaca (bpm)	-0,073	0,022	0,080	0,0017
FEVE Área comprimento (%)				
Peso (g)	-0,017	0,032	0,002	0,5966
Frequência cardíaca (bpm)	-0,059	0,018	0,088	0,0013
FEVE Rastreamento de pontos (%)				
Peso (g)	0,028	0,045	0,003	0,5398
Frequência cardíaca (bpm)	-0,1135	0,022	0,198	<0,0001

EP= erro padrão; R² = coeficiente de determinação; DDFVE= diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; DSFVE= diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo; VE= ventrículo esquerdo; FEVE= fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

Os resultados da análise de regressão linear para os parâmetros de deformação endocárdica global estão descritos na Tabela 8. O valor da FC apresentou correlação com os resultados da S_l e S_c ($p=0,003$ e $p<0,0001$, respectivamente). Por sua vez, o peso não influenciou o resultado da deformação em nenhum dos eixos.

Tabela 8 - Análise de regressão linear para os parâmetros de deformação endocárdica em hamsters

	Coeficiente Beta	EP	R^2	p
S_l (%)				
Peso (g)	0,005	0,023	0,0005	0,8138
Frequência cardíaca (bpm)	0,045	0,012	0,117	0,0003
S_c (%)				
Peso	-0,015	0,023	0,004	0,5081
Frequência cardíaca	0,059	0,011	0,206	<0,0001
S_r (%)				
Peso	-0,044	0,053	0,006	0,4117
Frequência cardíaca	0,006	0,029	0,0004	0,8383

EP= erro padrão; R^2 = coeficiente de determinação; S_l = deformação longitudinal global; S_c = deformação circunferencial global; S_r = deformação radial global.

4.3 Avaliação da variabilidade interobservador e intraobservador

As análises de variabilidade interobservador e intraobservador estão descritas na Tabela 9. Para a análise intraobservador, o CV para os parâmetros de ecocardiografia convencional variou de 1,33% a 9,26%, correspondendo às medidas do DDFVE pelo Modo M e da FEVE pelo método de área comprimento, respectivamente. O menor CV para a análise intraobservador para os parâmetros de deformação do endocárdio foi obtido na análise da S_c (7,10%); porém o maior CCI para as análises intraobservador e interobservador foi obtido na análise da S_l (0,92 e 0,91, respectivamente).

Tabela 9 - Análise da variabilidade interobservador e intraobservador em hamsters

	Análise intraobservador		Análise interobservador	
	CV (%)	CCI	CV (%)	CCI
Ecocardiografia				
convencional				
DDFVE	1,33	0,97	2,21	0,94
DSFVE	2,92	0,95	4,40	0,94
Massa do VE	7,67	0,85	11,54	0,68
FEVE Teichholz	4,25	0,91	5,66	0,86
FEVE Área	9,26	0,49	7,24	0,52
comprimento				
FEVE rastreamento de	5,53	0,90	8,37	0,74
pontos				
Deformação endocárdica				
S _l	7,99	0,92	11,10	0,91
S _c	7,10	0,85	7,41	0,77
S _r	10,85	0,73	13,63	0,67

CV= coeficiente de variação; **CCI**= coeficiente de correlação intraclass; **DDFVE**= diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; **DSFVE**= diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo; **VE**= ventrículo esquerdo; **FEVE**= fração de ejeção do ventrículo esquerdo; **S_l**= deformação longitudinal; **S_r**= deformação radial; **S_c**= deformação circunferencial.

Os gráficos de dispersão de Bland-Altman para a variabilidade intraobservador das medidas do DDFVE, do DSFVE e da massa do VE estão apresentados no Gráfico 8; e no Gráfico 9 estão demonstrados os gráficos de dispersão de Bland-Altman para a variabilidade intraobservador das medidas da FEVE por três métodos de estimativas de volumes. A FEVE, pelo método de Teichholz, apresentou a menor variabilidade interobservador. Os gráficos de dispersão de Bland-Altman para a variabilidade intraobservador das medidas de deformação endocárdica global estão apresentados no Gráfico 10. Os gráficos de dispersão de Bland-Altman para a variabilidade interobservador estão descritos nos Apêndices E, F e G.

Gráfico 8 - Gráficos de dispersão de Bland-Altman. Análise intraobservador de parâmetros de geometria do ventrículo esquerdo em hamsters.

Gráfico 9: Gráficos de dispersão de Bland Altman. Análise intraobservador para o cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo por diferentes métodos de quantificação de volume em hamsters.

Gráfico 10: Gráficos de dispersão de Bland-Altman. Análise intraobservador para a deformação endocárdica global em hamsters.

5. Discussão

O presente estudo é o primeiro a aplicar a técnica de rastreamento de pontos em hamsters, animais amplamente empregados em modelos experimentais. Nossos resultados mostram que a ecocardiografia convencional e a análise da deformação endocárdica são altamente exequíveis neste modelo experimental animal. IR 95% para as variáveis de ecocardiografia convencional e de deformação miocárdica foram determinados para guiar estudos futuros. A S_l e S_c apresentam elevada reprodutibilidade intraobservador e interobservador; assim como a FEVE estimada pelos métodos de Teichholz e pelo método de rastreamento de pontos. Além disso, mostramos que o aumento do peso está relacionado ao aumento do DDFVE, do DSFVE e da massa do VE; e que o aumento da FC dos animais está relacionado com valores mais baixos de S_l e S_c .

Estudos que buscam definir IR idealmente devem incluir amostras com mais de 120 indivíduos(84). Nessas situações, os IR podem ser estabelecidos pela utilização de métodos não paramétricos. No entanto, devido ao elevado custo e tempo para a realização de estudos deste porte foram desenvolvidas ferramentas estatísticas para a definição de IR quando o número da amostra é menor que 120. O método robusto de Horn é uma delas e pode ser utilizado em amostra de 80 a 120 indivíduos(84,85), favorecendo a utilização de menor número de animais, abordagem altamente desejável do ponto de vista ético em pesquisa com animais(87).

Neste estudo, os hamsters apresentaram FC inferior à demonstrada por estes animais em repouso, o que pode ser atribuído ao agente anestésico utilizado e o que está de acordo com a literatura(88). Neste caso, a FC reduzida pode apresentar vantagem teórica na análise da deformação miocárdica, já que FC muito elevadas implicam em ciclos cardíacos mais curtos e com menos quadros, com maior dificuldade de rastreamento dos pontos(69). A diferença encontrada na FC nos EL e EC pode ser explicada pelo tempo diferente de aquisição das imagens. As imagens eram, inicialmente, obtidas em EL e, posteriormente, em EC. Com isso, ao adquirir a imagem em EC o tempo de efeito do anestésico era maior, com maior redução da FC induzida pelo anestésico.

A FC apresentou correlação positiva com o DDFVE e DSFVE e negativa com a fração de encurtamento e com a FEVE, independentemente do método

utilizado para a estimativa de volume. Isto reforça a necessidade de se reportar a FC em estudos que têm por objetivo a análise de parâmetros de geometria e função do VE.

A taxa de quadros obtida está de acordo com a recomendada em estudos prévios realizados em outros roedores. Bhan et al. (2014)(25) realizaram estudo de validação do ecocardiograma com a ressonância magnética cardíaca em 73 camundongos, utilizando o mesmo equipamento de ecocardiografia e a mesma estação de trabalho empregados no presente estudo. Os autores consideraram como critério de exclusão a taxa de quadros inferior a 75 qps. Neste estudo, a menor taxa de quadros utilizada foi de 158 qps, portanto acima do limite inferior aceito por Bhan et al. (2014)(25). Por outro lado, também há estudos experimentais que utilizaram taxas de quadros mais elevadas. Bauer et al. (2011)(75) realizaram estudo em camundongos com o mesmo equipamento de ecocardiografia utilizando o limite inferior de 200 qps para a análise da deformação miocárdica. No entanto, no referido estudo, a FC dos animais era elevada 560 ± 79 , sendo necessária maior taxa de quadros para o adequado rastreamento dos pontos.

Os maiores valores de taxas de quadros obtidos no EC em comparação com o EL no presente estudo podem ser explicados por questões técnicas. Os principais determinantes da taxa de quadros são a profundidade e o tamanho do setor da imagem(57). A profundidade é a mesma em ambas as projeções, mas a largura do feixe não. No EC é possível reduzir a largura aumentando a taxa de quadros, enquanto que no EL a largura deve ser aumentada para acomodar todo o L do VE.

O valor da taxa de quadros é um importante parâmetro de qualidade em qualquer estudo de deformação miocárdica, pois pode interferir no valor da deformação. Devido aos movimentos de rotação e translação do VE durante o ciclo cardíaco a região do miocárdio em análise pode sair fora do plano de clivagem do ecocardiograma bidimensional, levando à perda do rastreamento dos pontos entre dois quadros consecutivos e, conseqüentemente, a valores reduzidos da deformação. Atualmente, alguns aparelhos de ecocardiografia clínica permitem aumentar a taxa de quadros sem a mudança da profundidade ou

da largura do setor. Mas quando a taxa de quadros é aumentada dessa forma pode ocorrer queda na resolução espacial da imagem bidimensional, resultando também em valores reduzidos de deformação(57). No presente estudo, foram realizados ajustes apenas na profundidade e na largura do setor para a otimização da taxa de quadros.

5.1 Avaliação da exequibilidade

O estudo atual é importante ao definir a exequibilidade da realização de medidas de ecocardiografia em hamsters já que nesses animais existem dificuldades técnicas relativas à elevada FC, ao tamanho reduzido dos animais e à dificuldade de obtenção de boas imagens para análise.

Um estudo de exequibilidade pode avaliar a praticidade, o custo benefício e a implementação de novas técnicas diagnósticas ou terapêuticas, e isso não é sinônimo de estudo piloto, termo que se refere a um estudo em miniatura com todas as características de um estudo principal(89,90). Não existem valores definidos como ideais para se considerar uma técnica como exequível, havendo subjetividade nesse conceito.

A exequibilidade da realização de medidas derivadas do modo M (DDFVE, DSFVE, Massa do VE, fração de encurtamento e FEVE pelo método de Teichholz) foi de 95%; enquanto que a exequibilidade da FEVE pelo método de área comprimento foi de 93% e pelo método de rastreamento de pontos de 84%. O método de rastreamento de pontos é mais dependente de imagens de boa qualidade em diversos segmentos do VE, o que justifica uma menor exequibilidade por este método.

Diversos estudos em humanos e em modelos experimentais animais buscaram avaliar a exequibilidade da realização de medidas derivadas do método de rastreamento de pontos(81,83,91). Takano et al. (2015)(91) estudaram a S_c e S_r em 33 gatos e a exequibilidade de tais medidas foi de 97,6%. Westrup et al. (2013)(81), em estudo realizado com 54 cães da raça Lébre irlandês encontraram exequibilidade de 85,2% na medida da S_l , S_r e S_c . Existem diferenças entre as

imagens obtidas em diferentes espécies animais e por esse motivo também existem diferenças em relação à exequibilidade. Isto é de fundamental importância na análise da deformação miocárdica pelo rastreamento de pontos, método dependente de imagens bidimensionais de boa qualidade técnica(69,77).

No presente estudo, a análise da deformação endocárdica global apresentou boa exequibilidade (84% para a deformação no EL e 80% para a deformação no EC). No EL, os segmentos endocárdicos menos exequíveis foram os segmentos apicais (84%), enquanto que no EC, os segmentos menos exequíveis foram o AL, IL e SI (85%, 85% e 83%, respectivamente). Por outro lado, a exequibilidade da deformação do epicárdio foi menor (42% para o EL e 62% para o EC). Tais diferenças podem estar relacionadas com aspectos técnicos da geração da imagem bidimensional e serão exploradas no item “5.4 Avaliação da deformação miocárdica”.

5.2 Avaliação da estrutura ventricular esquerda

O presente estudo evidenciou valores de DDFVE, DSFVE, massa do VE e fração de encurtamento de 6,5(6,2-6,8) mm; 4,4±0,4 mm; 263±46 mg e 32,7±4,1%; respectivamente. Por outro lado, em outro estudo Salemi et al. (2005)(92) encontraram valores de 4,1±0,4 mm; 2,3±0,4 mm; 190±40 mg e 44,7±6,6%, respectivamente. No entanto, enquanto estes autores utilizaram animais de 10 semanas submetidos à indução anestésica com pentobarbital 50 mg/kg, no presente estudo os animais apresentavam 12 semanas e foram anestesiados com ketamina/xilazina intramuscular. A diferença de idade pode resultar em diferença no tamanho e peso dos animais, interferindo na medida dos diâmetros e da massa do VE. A escolha por ketamina/xilazina foi baseada em estudo prévio realizado em hamsters, que evidenciou menor interferência deste agente anestésico na FEVE(88).

O DDFVE e o DSFVE são medidas lineares utilizadas para avaliar o tamanho do VE. No entanto, tal câmara cardíaca é uma estrutura tridimensional e isso pode explicar o fato de tais medidas nem sempre predizerem de forma adequada a dilatação do VE, mesmo em humanos(93). Além disso, como

demonstrado na análise de regressão linear, tais medidas apresentaram correlação positiva com o peso. Desta forma optamos por também apresentar valores do DDFVE, do DSFVE e da massa do VE indexados para o peso.

Existem diversas críticas em relação ao cálculo da massa do VE quando realizada por diferentes métodos pela ecocardiografia bidimensional. As fórmulas validadas em estudos de necropsia se basearam em um número restrito de amostras: 34 e 52 indivíduos(31, 32). Além disso, um estudo posterior com amostra maior (93 pacientes) apresentou correlação apenas moderada (coeficiente de correlação entre 0,58 e 0,67) entre a massa do VE obtida por necropsia e os valores estimados pelo ecocardiograma bidimensional com diferentes fórmulas para o cálculo da massa do VE(94).

Ao se estimar a massa do VE pela ecocardiografia bidimensional são necessárias diversas medidas, sendo que o erro em uma delas é elevado à terceira potência pela fórmula de cálculo da massa do VE. É natural que existam preocupações quanto à reprodutibilidade de sua medida em diversos estudos clínicos e experimentais animais. Em estudo clínico recente, envolvendo 3499 pacientes, sob o epônimo CARDIA Y25, Armstrong et al. (2015)(77) relataram que o CV na análise interobservador foi de 11,8% e na análise intraobservador foi de 10,3%. Neste estudo, os resultados encontrados foram de 7,67% e 11,54%, respectivamente. Até onde se sabe, não existem estudos desenhados para avaliar a reprodutibilidade de tal medida em roedores. Recentemente, Crowley et al. (2016)(95) conduziram um estudo para avaliar a reprodutibilidade de medidas ecocardiográficas em humanos e com isso buscaram estabelecer valores ideais de CV e CCI para as medidas de VDFVE, massa do VE e FEVE. Neste estudo, foram definidos como ideais um CV <10% e CCI >0.85 para as medidas do índice de massa do VE.

Com o advento do ecocardiograma tridimensional, a massa do VE pode ser de fato aferida, e não apenas estimada, como é feito pela ecocardiografia bidimensional(96-98). No entanto, ainda é um método de maior custo, menos disponível e dependente de condições técnicas como a qualidade da imagem e o equipamento utilizado(29).

5.3 Avaliação da fração de ejeção do ventrículo esquerdo

A FEVE obtida utilizando a fórmula de Teichholz é uma técnica atualmente menos utilizada em humanos pelos inúmeros problemas relacionados às extrapolações geométricas com esta fórmula. Dentre eles, destaca-se a menor acurácia em pacientes com doenças segmentares (33,36). A última recomendação da Sociedade Americana de Ecocardiografia, publicada em 2015, não recomenda a estimativa dos volumes do método de Teichholz(33). No entanto, este é um método simples, de fácil e rápida execução e amplamente disponível, já que não é dependente de programas de computador específicos para análise. Apresenta, ainda, utilidade em modelos experimentais animais, especialmente quando a janela apical não permite boas imagens para o cálculo da FEVE pelo método de Simpson biplanar, situação comum em roedores. No presente estudo, tal método revelou maiores valores de FEVE ($59,0 \pm 5,8\%$) e melhor reprodutibilidade intraobservador e interobservador (CV intraobservador=4,25%, CV interobservador=5,66% e CCI=0,92). É importante ressaltar que todos os animais eram saudáveis, sendo que a reprodutibilidade pode ser menor em situações de alterações da geometria ou da mobilidade segmentar do VE pelas limitações que essas alterações impõem a esse método, como já citado (33,36).

Os dados disponíveis até o momento para hamsters foram obtidos apenas de grupos controles em ensaios experimentais, com número reduzido de animais(5,8,9,13). Como não foram encontrados estudos em hamsters utilizando os métodos de área comprimento e de rastreamento de pontos para a estimativa da FEVE, este é um estudo pioneiro que aplicou estas técnicas neste modelo experimental animal.

No presente estudo, foram apresentados IRs para a FEVE utilizando três métodos de estimativa de volumes. No entanto, por ser este descritivo, não é possível afirmar que determinado método apresente superioridade para o cálculo da FEVE. Para isso, considerou-se necessária a realização de um novo estudo analisando essas três formas de estimar a FEVE pelo ecocardiograma bidimensional com outro método como padrão ouro. Uma importante contribuição

deste estudo foi definir a exequibilidade dos métodos, auxiliando futuras pesquisas no planejamento de tamanhos amostrais.

Em estudo realizado com 73 camundongos, Bhan et al. (2014)(25) obtiveram valores de FEVE, pelo método de rastreamento de pontos ($54.0 \pm 1,3\%$), sistematicamente inferiores aos observados à ressonância magnética cardíaca (viés negativo de 4,78%), porém com boa correlação entre os métodos ($r=0,93$; $p<0,0001$). A correlação entre a ressonância magnética cardíaca e a FEVE pelo método de área comprimento foi menor ($r=0,77$; $p<0,0001$). A FEVE obtida pelos métodos de rastreamento de pontos e área comprimento apresentou boa variabilidade intraobservador (diferença média de $2,6 \pm 2$ e $4,8 \pm 3,4$, respectivamente) e interobservador (diferença média de $2,3 \pm 4,1$ e $4,8 \pm 3,4$, respectivamente), sendo que o método de Teichholz não foi avaliado neste estudo.

Não foram encontrados estudos avaliando a reprodutibilidade de medidas de FEVE em hamsters. Crowley et al. (2016)(95) sugeriram como ideal um CV $<8\%$ e CCI $>0,85$ para as medidas da FEVE em humanos. No presente estudo, o método de área comprimento foi o único que apresentou CV intraobservador superior a 8% (9,26%) e CCI inferior a 0,85 (0,49).

Existe a perspectiva de que a FEVE calculada pelo ecocardiograma tridimensional apresente melhores resultados em comparação com outros métodos de imagem, também em modelos experimentais animais, o que já está comprovado em humanos(96). Tidholm et al. (2010)(99) analisaram 85 cães e demonstraram boa correlação da FEVE com os métodos de Teichholz, de Simpson biplanar e tridimensional, apesar da superestimativa do cálculo do volume por esta técnica, tanto em animais saudáveis quanto naqueles com miocardiopatias. Entretanto, os estudos com ecocardiografia tridimensional ainda são limitados em roedores pelo elevado custo e baixa disponibilidade.

5.4 Análise da deformação miocárdica

Neste estudo, os valores encontrados para a deformação de pico sistólico endocárdico global foram de $-13,6(-7,5;-20,4)\%$; $-20,5 \pm 3,1\%$ e $+34,7 \pm 7,0\%$, para a

S_l , S_c e S_r , respectivamente. Não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram a deformação em hamsters. A S_c apresentou menor CV (6,78%) e a S_r apresentou maior CV (11,15%) e os menores valores de CCI foram encontrados para a S_l (0,92 e 0,91 para a análise intraobservador e interobservador, respectivamente). Em humanos, habitualmente, a S_l apresenta menor variabilidade que a S_c e a S_r (69). Nestes, as imagens são obtidas pela janela apical e o sentido da S_l ocorre de forma paralela à incidência dos feixes de ultrassom, o que tem sido apontado como um dos fatores que influenciam a variabilidade por essa projeção, pois na ecocardiografia a resolução axial é maior que a lateral(69,100). Por outro lado, em roedores, a S_l é obtida na projeção paraesternal EL. Assim, o sentido da S_l ocorre perpendicularmente ao feixe de ultrassom. Além disso, a menor resolução lateral pode explicar a menor exequibilidade da deformação endocárdica dos segmentos apicais no EL e dos segmentos AL, IL e SI no EC.

Até o momento, a avaliação da deformação do epicárdio tem pouca utilidade na prática clínica(33,69). Por esse motivo, optou-se por apresentar os dados obtidos para a deformação epicárdica global no Apêndice A.

A avaliação da deformação segmentar, mesmo em humanos, é usualmente menos reprodutível do que a da deformação global(58,71,72,101). A última recomendação da Sociedade Americana de Ecocardiografia(33) não estabeleceu valores de referência para parâmetros de deformação miocárdica regional, pelo número ainda reduzido de estudos que justificassem tal conduta. Considera-se que esta ferramenta ainda não esteja completamente pronta para aplicação, tanto experimental quanto clínica. No entanto, mais dados foram disponibilizados nos últimos anos(72,77), o que pode futuramente ser incorporado às recomendações de avaliação de deformação miocárdica. Por esse motivo, optou-se por apresentar os IRs para os índices de deformação segmentar nos Apêndices B, C e D.

Uma potencial aplicação prática da análise da deformação miocárdica segmentar é na miocardiopatia chagásica. Estudo prévio demonstrou que nessa patologia alterações da mobilidade segmentar do VE, mesmo quando avaliada de forma qualitativa, se correlacionam com pior prognóstico, antes mesmo da

detecção de disfunção sistólica global do VE(102). Desse modo, novas ferramentas que permitam a detecção precoce e mais objetiva das disfunções segmentares do VE, como a análise da deformação miocárdica pelo método de rastreamento de pontos, podem ajudar na elucidação de mecanismos e mesmo orientar o seguimento de pacientes com miocardiopatia chagásica. Barbosa et al. (2014)(66) avaliaram a deformação miocárdica global e segmentar em pacientes portadores de doença de Chagas assintomáticos e sem evidências clínicas de envolvimento cardíaco. Neste estudo encontrou-se redução da S_r global e S_l dos segmentos inferior basal e septo anterior basal em relação ao grupo controle, sem alterações nos parâmetros de ecocardiografia convencional entre os dois grupos(66). Por sua vez, Gomes et al. (2016)(103), em estudo prospectivo, não observaram diferenças nos valores de S_l , S_r e S_c entre indivíduos normais e com doença de Chagas em fase inicial. No entanto, naqueles que apresentavam fibrose à ressonância magnética cardíaca evidenciaram menores valores de S_l , S_r e S_c .

Importante ressaltar também que os valores obtidos de deformação miocárdica não são intercambiáveis para diversos equipamentos e *softwares* utilizados(57,69). Tal fato também já foi demonstrado em roedores. Tee et al. (2014)(104) compararam a deformação miocárdica utilizando dois equipamentos de ecocardiografia: um deles dedicado a pequenos animais Vevo[®] 2100 com transdutor linear MS400 (VisualSonics Inc, Toronto, Canada) e o outro, um equipamento de uso clínico humano, o Vivid 7, com transdutor linear i13L (GE Corporate, Horton, Norway)(104). Neste estudo, realizado em camundongos, os valores de S_l e S_r foram semelhantes quando obtidos com os dois diferentes equipamentos ($-16,8 \pm 1,7\%$ *versus* $-18,7 \pm 3,1\%$, $p=0,11$) para a S_l e $46,8 \pm 14,2\%$ *versus* $41,0 \pm 9,5\%$ para a S_r ($p=0,26$). Por outro lado, a S_c foi menor quando utilizado o Vevo[®] 2100 ($-16,9 \pm 3,1\%$ *versus* $-27,0 \pm 5,2\%$, $p<0,05$).

Os IR aqui apresentados foram definidos de acordo com critérios exclusivamente estatísticos. No entanto, tal resultado deve ser interpretado com cuidado, pois pode não representar o valor de referência clínico(85). Em artigo de revisão sobre a utilização de IR, Horowitz (2008)(86) utilizou o seguinte exemplo: ao analisar o valor de colesterol em uma amostra de 120 indivíduos,

aparentemente saudáveis, o IR 95% encontrado foi de 139 mg/dl a 273 mg/dl. No entanto, estudos clínicos prévios demonstraram que indivíduos com colesterol total superior a 200 mg/dl apresentam risco aumentado de doença arterial coronariana. Desse modo, o valor de referência clínico para o colesterol é de 200 mg/dl, baseado em estudos clínicos de avaliação de prognóstico. Da mesma forma, os IR apresentados neste estudo devem ser analisados em conjunto com outros estudos subsequentes, de preferência que avaliem o impacto prognóstico dos índices obtidos para análise de estrutura e função do VE.

5.5 Limitações

Os critérios de exclusão foram exclusivamente clínicos, não sendo realizada análise bioquímica para identificação de patologias subjacentes. No entanto, tal análise envolveria maior quantidade de recursos e a utilização de procedimentos invasivos que poderiam levar a maior sofrimento dos animais.

Foram utilizados apenas hamsters fêmeas no estudo.

Os agentes anestésicos podem interferir nos valores de FC, e em variáveis de avaliação de estrutura e função do VE porém não foram encontradas na literatura informações à respeito do efeito de diferentes anestésicos na deformação miocárdica.

Não foram encontradas na literatura informações à respeito da evolução das medidas citadas com o envelhecimento dos animais. O presente estudo não foi delineado com esse objetivo. Para isso, o ideal seria a condução de um novo estudo que permitisse acompanhar os mesmos animais de maneira longitudinal. Dessa forma, os resultados aqui apresentados não devem ser extrapolados para hamsters de outras idades.

6. Conclusões

Após análise dos resultados concluiu-se que:

1. A exequibilidade da realização das medidas de ecocardiografia convencional e de medidas de deformação endocárdica se mostrou elevada;
2. A exequibilidade da realização de medidas de deformação epicárdica foi baixa;
3. Observou-se fraca correlação positiva entre a FEVE pelo método de Teichholz e a FEVE pelos métodos de área comprimento e rastreamento de pontos e razoável correlação positiva entre a FEVE obtida pelos métodos de área comprimento e de rastreamento de pontos;
4. O peso se correlacionou com as seguintes variáveis: DDFVE, DSFVE e massa do VE, enquanto que na FC houve correlação negativa com a FEVE e com a fração de encurtamento, e correlação positiva com a S_l e S_c , mas não com a S_r ;
5. Verificou-se variabilidade elevada na estimativa da massa do VE e dentre os métodos de avaliação da FEVE, o método de Teichholz apresentou menor variabilidade interobservador e intraobservador;
6. Os IR apresentados podem ser utilizados como referência para estudos futuros realizados com o mesmo modelo experimental; e podem também ser a base para o desenvolvimento de pesquisas com fins prognósticos.

7. Referências Bibliográficas¹

¹Elaboradas de acordo com as Diretrizes para Elaboração de Dissertações e Teses da USP: Documento Eletrônico e Impresso - Parte IV (Vancouver) 2 ed. São Paulo: SIBi/USP, 2009.

1. Ramírez LE, Lages-Silva E, Soares Júnior 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 Jul-Sep;27(3):163-9.
2. Ikeda Y, Ross J. Models of dilated cardiomyopathy in the mouse and the hamster. *Curr Opin Cardiol*. 2000 May;15(3):197-201.
3. 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 Oct;5(12):1116-24.
4. de Oliveira LF, Romano MM, de Carvalho EE, Cabeza JM, Salgado HC, Fazan Júnior R, et al. Histopathological Correlates of Global and Segmental Left Ventricular Systolic Dysfunction in Experimental Chronic Chagas Cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc*. 2016 Jan;5(1).
5. Nakai K, Ahmad M, Nakaki M, Wilkinson R, Callahan RJ, Elmaleh DR, et al. Serial course of left ventricular function, perfusion and fatty acid uptake in the cardiomyopathic hamster. *J Nucl Med*. 1993 Aug;34(8):1309-15.
6. Jin D, Takai S, Shiota N, Miyazaki M. Roles of vascular angiotensin converting enzyme and chymase in two-kidney, one clip hypertensive hamsters. *J Hypertens*. 1998 May;16(5):657-64.
7. Colmanetti FH, Teixeira VeP, Rodrigues ML, Chica JE, Reis M, dos Santos VM. Myocardocyte ultrastructure and morphometrical analysis in hamsters experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Ultrastruct Pathol*. 2005 Mar-Apr;29(2):139-47.
8. Crespo MJ, Cruz N, Altieri PI, Escobales N. Enalapril and losartan are more effective than carvedilol in preventing dilated cardiomyopathy in the Syrian cardiomyopathic hamster. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2008 Sep;13(3):199-206.
9. Crespo MJ, Cruz N, Altieri PI, Escobales N. Chronic treatment with N-acetylcysteine improves cardiac function but does not prevent progression of

- cardiomyopathy in Syrian cardiomyopathic hamsters. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011 Jun;16(2):197-204.
10. Fernandes F, Ramires FJ, Ianni BM, Salemi VM, Oliveira AM, Pessoa FG, et al. Effect of colchicine on myocardial injury induced by *Trypanosoma cruzi* in experimental Chagas disease. *J Card Fail.* 2012 Aug;18(8):654-9.
 11. Hecker PA, Galvao TF, O'Shea KM, Brown BH, Henderson R, Riggle H, et al. High-sugar intake does not exacerbate metabolic abnormalities or cardiac dysfunction in genetic cardiomyopathy. *Nutrition.* 2012 May;28(5):520-6.
 12. Pimentel WeS, Ramires FJ, Lanni BM, Salemi VM, Bilate AM, Cunha-Neto E, et al. The effect of beta-blockade on myocardial remodelling in Chagas' cardiomyopathy. *Clinics (Sao Paulo).* 2012 Sep;67(9):1063-9.
 13. Crespo MJ, Cangiano JL, Altieri PI, Escobales N. Aliskiren improves left ventricular dysfunction and reduces cardiac dilation in Syrian cardiomyopathic hamsters. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2012 Jun;59(6):547-52.
 14. Befera NT, Badea CT, Johnson GA. Comparison of 4D-microSPECT and microCT for murine cardiac function. *Mol Imaging Biol.* 2014 Apr;16(2):235-45.
 15. Berry CJ, Thedens DR, Light-McGroary K, Miller JD, Kutschke W, Zimmerman KA, et al. Effects of deep sedation or general anesthesia on cardiac function in mice undergoing cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2009;11:16.
 16. Kober F, Iltis I, Cozzone PJ, Bernard M. Cine-MRI assessment of cardiac function in mice anesthetized with ketamine/xylazine and isoflurane. *MAGMA.* 2004 Dec;17(3-6):157-61.
 17. Soltysiak P, Saxena AK. Micro-computed tomography for implantation site imaging during in situ oesophagus tissue engineering in a live small animal model. *J Tissue Eng Regen Med.* 2009 Oct;3(7):573-6.
 18. Wu MC, Gao DW, Sievers RE, Lee RJ, Hasegawa BH, Dae MW. Pinhole single-photon emission computed tomography for myocardial perfusion imaging of mice. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Aug;42(3):576-82.

19. Kanno S, Lerner DL, Schuessler RB, Betsuyaku T, Yamada KA, Saffitz JE, et al. Echocardiographic evaluation of ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *J Am Soc Echocardiogr*. 2002 Jun;15(6):601-9.
20. Ram R, Mickelsen DM, Theodoropoulos C, Blaxall BC. New approaches in small animal echocardiography: imaging the sounds of silence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Nov;301(5):H1765-80.
21. Youn HJ, Rokosh G, Lester SJ, Simpson P, Schiller NB, Foster E. Two-dimensional echocardiography with a 15-MHz transducer is a promising alternative for in vivo measurement of left ventricular mass in mice. *J Am Soc Echocardiogr*. 1999 Jan;12(1):70-5.
22. Rottman JN, Ni G, Brown M. Echocardiographic evaluation of ventricular function in mice. *Echocardiography*. 2007 Jan;24(1):83-9.
23. Romano MM, Pazin-Filho A, O'Connel JL, Simões MV, Schmidt A, Campos É, et al. Early detection of doxorubicin myocardial injury by ultrasonic tissue characterization in an experimental animal model. *Cardiovasc Ultrasound*. 2012;10:40.
24. Egemnazarov B, Schmidt A, Crnkovic S, Sydykov A, Nagy BM, Kovacs G, et al. Pressure Overload Creates Right Ventricular Diastolic Dysfunction in a Mouse Model: Assessment by Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015 Jul;28(7):828-43.
25. Bhan A, Sirker A, Zhang J, Protti A, Catibog N, Driver W, et al. High-frequency speckle tracking echocardiography in the assessment of left ventricular function and remodeling after murine myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014 May;306(9):H1371-83.
26. Scherrer-Crosbie M, Thibault HB. Echocardiography in translational research: of mice and men. *J Am Soc Echocardiogr*. 2008 Oct;21(10):1083-92.
27. Vakili BA, Okin PM, Devereux RB. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J*. 2001 Mar;141(3):334-41.

-
28. Foppa M, Duncan BB, Rohde LE. Echocardiography-based left ventricular mass estimation. How should we define hypertrophy? *Cardiovasc Ultrasound*. 2005 Jun;3:17.
 29. Armstrong AC, Gidding S, Gjesdal O, Wu C, Bluemke DA, Lima JA. LV mass assessed by echocardiography and CMR, cardiovascular outcomes, and medical practice. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2012 Aug;5(8):837-48.
 30. Troy BL, Pombo J, Rackley CE. Measurement of left ventricular wall thickness and mass by echocardiography. *Circulation*. 1972 Mar;45(3):602-11.
 31. Devereux RB, Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method. *Circulation*. 1977 Apr;55(4):613-8.
 32. Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, et al. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol*. 1986 Feb;57(6):450-8.
 33. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo 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 Mar;16(3):233-70.
 34. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo 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. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015 Jan;28(1):1-39.e14.
 35. Meller J, Herman MV, Teichholz LE. Noninvasive assessment of left ventricular function. *Adv Intern Med*. 1979;24:331-57.
 36. 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 Jan;37(1):7-11.

-
37. Gueret P, Meerbaum S, Zwehl W, Wyatt HL, Davidson RM, Uchiyama T, et al. Two-dimensional echocardiographic assessment of left ventricular stroke volume: experimental correlation with thermodilution and cineangiography in normal and ischemic states. *Cathet Cardiovasc Diagn*. 1981;7(3):247-58.
 38. Marwick TH. Techniques for comprehensive two dimensional echocardiographic assessment of left ventricular systolic function. *Heart*. 2003 Nov;89 Suppl 3:iii2-8.
 39. Greene DG, Carlisle R, Grant C, Bunnell IL. Estimation of left ventricular volume by one-plane cineangiography. *Circulation*. 1967 Jan;35(1):61-9.
 40. Cohn PF, Gorlin R, Cohn LH, Collins JJ. Left ventricular ejection fraction as a prognostic guide in surgical treatment of coronary and valvular heart disease. *Am J Cardiol*. 1974 Aug;34(2):136-41.
 41. Nelson GR, Cohn PF, Gorlin R. Prognosis in medically-treated coronary artery disease: influence of ejection fraction compared to other parameters. *Circulation*. 1975 Sep;52(3):408-12.
 42. Bestetti RB, Dalbo CM, Freitas OC, Teno LA, Castilho OT, Oliveira JS. Noninvasive predictors of mortality for patients with Chagas' heart disease: a multivariate stepwise logistic regression study. *Cardiology*. 1994;84(4-5):261-7.
 43. Martinelli Filho M, Sosa E, Nishioka S, Scanavacca M, Bellotti G, Pileggi F. Clinical and electrophysiologic features of syncope in chronic chagasic heart disease. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1994 Jul;5(7):563-70.
 44. Barretto AC, Mady C, Ianni BM, Arteaga E, Cardoso RH, da Luz PL, et al. Relationship between ventricular arrhythmia and cardiac function in Chagas disease. *Arq Bras Cardiol*. 1995 Jun;64(6):533-5.
 45. Solomon SD, Anavekar N, Skali H, McMurray JJ, Swedberg K, Yusuf S, et al. Influence of ejection fraction on cardiovascular outcomes in a broad spectrum of heart failure patients. *Circulation*. 2005 Dec;112(24):3738-44.

-
46. Cikes M, Solomon SD. Beyond ejection fraction: an integrative approach for assessment of cardiac structure and function in heart failure. *Eur Heart J*. 2016 Jun;37(21):1642-50.
 47. Greenbaum RA, Ho SY, Gibson DG, Becker AE, Anderson RH. Left ventricular fibre architecture in man. *Br Heart J*. 1981 Mar;45(3):248-63.
 48. 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 Jul;26(1):195-202.
 49. 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 Feb;63(5):447-56.
 50. 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 Oct;21(10):1138-44.
 51. Fang ZY, Leano R, Marwick TH. Relationship between longitudinal and radial contractility in subclinical diabetic heart disease. *Clin Sci (Lond)*. 2004 Jan;106(1):53-60.
 52. Gonçalves 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 Jan;33(1):27-37.
 53. Quinones MA, Gaasch WH, Alexander JK. Echocardiographic assessment of left ventricular function with special reference to normalized velocities. *Circulation*. 1974 Jul;50(1):42-51.
 54. Rösner A, Bijmens B, Hansen M, How OJ, Aarsaether E, Müller S, et al. Left ventricular size determines tissue Doppler-derived longitudinal strain and strain rate. *Eur J Echocardiogr*. 2009 Mar;10(2):271-7.

-
55. Storaas C, Aberg P, Lind B, Brodin LA. Effect of angular error on tissue Doppler velocities and strain. *Echocardiography*. 2003 Oct;20(7):581-7.
 56. Urheim S, Edvardsen T, Torp H, Angelsen B, Smiseth OA. Myocardial strain by Doppler echocardiography. Validation of a new method to quantify regional myocardial function. *Circulation*. 2000 Sep;102(10):1158-64.
 57. Mor-Avi V, Lang RM, Badano LP, Belohlavek M, Cardim NM, Derumeaux G, et al. Current and evolving echocardiographic techniques for the quantitative evaluation of cardiac mechanics: ASE/EAE consensus statement on methodology and indications endorsed by the Japanese Society of Echocardiography. *Eur J Echocardiogr*. 2011 Mar;12(3):167-205.
 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 Feb;47(4):789-93.
 59. Marwick TH, Leano RL, Brown J, Sun JP, Hoffmann R, Lysyansky P, et al. Myocardial strain measurement with 2-dimensional speckle-tracking echocardiography: definition of normal range. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2009 Jan;2(1):80-4.
 60. Nishikage T, Nakai H, Mor-Avi V, Lang RM, Salgo IS, Settlemier SH, et al. Quantitative assessment of left ventricular volume and ejection fraction using two-dimensional speckle tracking echocardiography. *Eur J Echocardiogr*. 2009 Jan;10(1):82-8.
 61. Peng Y, Popovic ZB, Sopko N, Drinko J, Zhang Z, Thomas JD, et al. Speckle tracking echocardiography in the assessment of mouse models of cardiac dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Aug;297(2):H811-20.
 62. Haberka M, Liszka J, Kozyra A, Finik M, Gąsior Z. Two-dimensional speckle tracking echocardiography prognostic parameters in patients after acute myocardial infarction. *Echocardiography*. 2015 Mar;32(3):454-60.
 63. Ersbøll M, Andersen MJ, Valeur N, Mogensen UM, Fakhri Y, Thune JJ, et al. Early diastolic strain rate in relation to systolic and diastolic function and prognosis in acute myocardial infarction: a two-dimensional speckle-tracking study. *Eur Heart J*. 2014 Mar;35(10):648-56.

-
64. Hassanin N, Alkemaary A. Early detection of subclinical uremic cardiomyopathy using two-dimensional speckle tracking echocardiography. *Echocardiography*. 2016 Apr;33(4):527-36.
 65. Saccheri MC, Cianciulli TF, Lax JA, Gagliardi JA, Cáceres GL, Quarín AE, et al. Two-dimensional speckle tracking echocardiography for early detection of myocardial damage in young patients with Fabry disease. *Echocardiography*. 2013 Oct;30(9):1069-77.
 66. Barbosa MM, Costa Rocha MO, Vidigal DF, Bicalho Carneiro ReC, Araújo RD, Palma MC, et al. Early detection of left ventricular contractility abnormalities by two-dimensional speckle tracking strain in Chagas' disease. *Echocardiography*. 2014 May;31(5):623-30.
 67. Zoroufian A, Razmi T, Taghavi-Shavazi M, Lotfi-Tokaldany M, Jalali A. Evaluation of subclinical left ventricular dysfunction in diabetic patients: longitudinal strain velocities and left ventricular dyssynchrony by two-dimensional speckle tracking echocardiography study. *Echocardiography*. 2014 Apr;31(4):456-63.
 68. Pirat B, Khoury DS, Hartley CJ, Tiller L, Rao L, Schulz DG, et al. A novel feature-tracking echocardiographic method for the quantitation of regional myocardial function: validation in an animal model of ischemia-reperfusion. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Feb;51(6):651-9.
 69. 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 Feb;28(2):183-93.
 70. Szulik M, Pappas CJ, Jurcut R, Magro M, Peeters E, Goetschalckx K, et al. Clinical validation of a novel speckle-tracking-based ejection fraction assessment method. *J Am Soc Echocardiogr*. 2011 Oct;24(10):1092-100.
 71. Bachner-Hinzenzon N, Ertracht O, Malka A, Leitman M, Vered Z, Binah O, et al. Layer-specific strain analysis: investigation of regional deformations in a rat model of acute versus chronic myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Sep;303(5):H549-58.

-
72. Shi J, Pan C, Kong D, Cheng L, Shu X. Left ventricular longitudinal and circumferential layer-specific myocardial strains and their determinants in healthy subjects. *Echocardiography*. 2016 Apr;33(4):510-8.
 73. Mada RO, Lysyansky P, Daraban AM, Duchenne J, Voigt JU. How to define end-diastole and end-systole?: Impact of timing on strain measurements. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2015 Feb;8(2):148-57.
 74. Morgan EE, Faulx MD, McElfresh TA, Kung TA, Zawaneh MS, Stanley WC, et al. Validation of echocardiographic methods for assessing left ventricular dysfunction in rats with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Nov;287(5):H2049-53.
 75. 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 Apr;108(8):908-16.
 76. Spurney C, Yu Q, Nagaraju K. Speckle tracking analysis of the left ventricular anterior wall shows significantly decreased relative radial strain patterns in dystrophin deficient mice after 9 months of age. *PLoS Curr*. 2011;3:RRN1273.
 77. Armstrong AC, Ricketts EP, Cox C, Adler P, Arynchyn A, Liu K, et al. Quality control and reproducibility in m-mode, two-dimensional, and speckle tracking echocardiography acquisition and analysis: The CARDIA study, Year 25 examination experience. *Echocardiography*. 2015 Aug;32(8):1233-40.
 78. Ferferieva V, Van den Bergh A, Claus P, Jasaityte R, La Gerche A, Rademakers F, et al. Assessment of strain and strain rate by two-dimensional speckle tracking in mice: comparison with tissue Doppler echocardiography and conductance catheter measurements. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2013 Aug;14(8):765-73.
 79. Li RJ, Yang J, Yang Y, Ma N, Jiang B, Sun QW, et al. Speckle tracking echocardiography in the diagnosis of early left ventricular systolic dysfunction in type II diabetic mice. *BMC Cardiovasc Disord*. 2014;14:141.
 80. Shao Y, Redfors B, Tang MS, Assarsson U, Omerovic E. Novel simple approach for detection of regional perturbations of cardiac function in mouse models of cardiovascular disease. *Echocardiography*. 2013 Aug;30(7):843-9.

-
81. Westrup U, McEvoy FJ. Speckle tracking echocardiography in mature Irish Wolfhound dogs: technical feasibility, measurement error and reference intervals. *Acta Vet Scand.* 2013;55:41.
 82. Guihaire J, Haddad F, Boulate D, Decante B, Denault AY, Wu J, et al. Non-invasive indices of right ventricular function are markers of ventricular-arterial coupling rather than ventricular contractility: insights from a porcine model of chronic pressure overload. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2013 Dec;14(12):1140-9.
 83. Visser LC, Scansen BA, Schober KE, Bonagura JD. Echocardiographic assessment of right ventricular systolic function in conscious healthy dogs: repeatability and reference intervals. *J Vet Cardiol.* 2015 Jun;17(2):83-96.
 84. Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, Szladovits B, Walton RM, Barnhart KF, et al. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol.* 2012 Dec;41(4):441-53.
 85. Geffré A, Friedrichs K, Harr K, Concordet D, Trumel C, Braun JP. Reference values: a review. *Vet Clin Pathol.* 2009 Sep;38(3):288-98.
 86. Horowitz GL. Reference Intervals: Practical Aspects. *EJIFCC.* 2008 Oct;19(2):95-105.
 87. Group NRRGW. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *J Physiol.* 2010 Jul;588(Pt 14):2519-21.
 88. Tanaka DM, Romano MMD, Carvalho EEV, Oliveira LFL, Souza HCD, 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 Aug;49(10):e5294
 89. Arain M, Campbell MJ, Cooper CL, Lancaster GA. What is a pilot or feasibility study? A review of current practice and editorial policy. *BMC Med Res Methodol.* 2010 Jul;10:67.
 90. Bowen DJ, Kreuter M, Spring B, Cofta-Woerpel L, Linnan L, Weiner D, et al. How we design feasibility studies. *Am J Prev Med.* 2009 May;36(5):452-7.

-
91. Takano H, Isogai T, Aoki T, Wakao Y, Fujii Y. Feasibility of radial and circumferential strain analysis using 2D speckle tracking echocardiography in cats. *J Vet Med Sci.* 2015 Feb;77(2):193-201.
 92. Salemi VM, Bilate AM, Ramires FJ, Picard MH, Gregio DM, Kalil J, et al. Reference values from M-mode and Doppler echocardiography for normal Syrian hamsters. *Eur J Echocardiogr.* 2005 Jan;6(1):41-6.
 93. Dujardin KS, Enriquez-Sarano M, Rossi A, Bailey KR, Seward JB. Echocardiographic assessment of left ventricular remodeling: are left ventricular diameters suitable tools? *J Am Coll Cardiol.* 1997 Nov;30(6):1534-41.
 94. Bachenberg TC, Shub C, Hauck AJ, Edwards WD. Can anatomical left ventricular mass be estimated reliably by M-mode echocardiography? A clinicopathological study of ninety-three patients. *Echocardiography.* 1991 Jan;8(1):9-15.
 95. Crowley AL, Yow E, Barnhart HX, Daubert MA, Bigelow R, Sullivan DC, et al. Critical review of current approaches for echocardiographic reproducibility and reliability assessment in clinical research. *J Am Soc Echocardiogr.* 2016 Oct 6. pii: S0894-7317(16)30397-2. [Epub ahead of print]
 96. Qi X, Cogar B, Hsiung MC, Nanda NC, Miller AP, Yelamanchili P, et al. Live/real time three-dimensional transthoracic echocardiographic assessment of left ventricular volumes, ejection fraction, and mass compared with magnetic resonance imaging. *Echocardiography.* 2007 Feb;24(2):166-73.
 97. Takeuchi M, Nishikage T, Mor-Avi V, Sugeng L, Weinert L, Nakai H, et al. Measurement of left ventricular mass by real-time three-dimensional echocardiography: validation against magnetic resonance and comparison with two-dimensional and m-mode measurements. *J Am Soc Echocardiogr.* 2008 Sep;21(9):1001-5.
 98. Chuang ML, Beaudin RA, Riley MF, Mooney MG, Mannin WJ, Douglas PS, et al. Three-dimensional echocardiographic measurement of left ventricular mass: comparison with magnetic resonance imaging and two-dimensional echocardiographic determinations in man. *Int J Card Imaging.* 2000 Oct;16(5):347-57.

-
99. Tidholm A, Westling AB, Höglund K, Ljungvall I, Häggström J. Comparisons of 3-, 2-dimensional, and M-mode echocardiographical methods for estimation of left chamber volumes in dogs with and without acquired heart disease. *J Vet Intern Med.* 2010 Nov-Dec;24(6):1414-20.
100. Risum N, Ali S, Olsen NT, Jons C, Khouri MG, Lauridsen TK, et al. Variability of global left ventricular deformation analysis using vendor dependent and independent two-dimensional speckle-tracking software in adults. *J Am Soc Echocardiogr.* 2012 Nov;25(11):1195-203.
101. Aurich M, Keller M, Greiner S, Steen H, Aus dem Siepen F, Riffel J, et al. Left ventricular mechanics assessed by two-dimensional echocardiography and cardiac magnetic resonance imaging: comparison of high-resolution speckle tracking and feature tracking. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2016 Mar.
102. 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 Apr;39(4):483-7.
103. 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 Jul;29(7):679-88.
104. Tee N, Gu Y, Murni, Shim W. Comparative myocardial deformation in 3 myocardial layers in mice by speckle tracking echocardiography. *Biomed Res Int.* 2015;2015:148501.

8. Anexo

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

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 n° 025/2016, sobre o projeto intitulado “*Efeito do uso prolongado de pentoxifilina sobre as alterações perfusionais miocárdicas e atividade inflamatória cardíaca e suas correlações com a evolução da disfunção sistólica ventricular esquerda em modelo de cardiomiopatia chagásica crônica no hamster*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Marcus Vinícius Simões** 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 25 de abril de 2016.

We certify that the protocol n° 025/2016, entitled “*Effect of prolonged use of pentoxifylline on myocardial perfusion abnormalities and cardiac inflammatory activity and their correlation with the development of left ventricular systolic dysfunction in a model of chronic Chagas cardiomyopathy in hamster*”, 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 in 04/25/2016.

Ribeirão Preto, 25 de abril de 2016.

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

9. *Apêndices*

APÊNDICE A

VALORES DE REFERÊNCIA PARA A DEFORMAÇÃO EPICÁRDICA GLOBAL POR PROJEÇÃO EM HAMSTERS

	Média±DP	IR 95%
S_l		
Epicárdica	-8,3±2,1	[-3,7; -12,9]
S_c		
Epicárdica	-10,2±1,9	[-6,1; -14,2]

DP= desvio padrão; **IR**= intervalo de referência; **S_l**= deformação longitudinal;
S_c= deformação circunferencial.

APÊNDICE B

VALORES DE REFERÊNCIA PARA A DEFORMAÇÃO LONGITUDINAL POR SEGMENTO EM HAMSTERS

	Média±DP ou Mediana(IIQ)	IR 95%
S_l		
Endocárdica		
Inferior basal	-12,0(-8,9; -22,2)	[-1,5; -21,3]
Inferior médio	-12,7±4,5	[-0,8; -24,5]
Ínfero apical	-17,0±6,1	[-0,7; -33,2]
Anterior basal	-14,4±6,4	[-2,5; -31,2]
Anterior médio	-14,5±4,4	[-2,7; -26,4]
Ântero apical	-12,2±4,9	[-1,1; -24,8]
Epicárdica		
Inferior basal	-10,5±5,4	[-4,3; -24,4]
Inferior médio	-7,5(-0,6; -18,0)	[-3,4; -18,5]
Ínfero apical	-10,2(-0,6; -21,4)	[-0,9; -21,3]
Anterior basal	-8,1±4,3	[-3,5; -19,5]
Anterior médio	-6,8±3,3	[-2,0; -15,8]
Ântero apical	-7,4(-1,2; -15,5)	[-3,1; -17,9]

DP= desvio padrão; **IIQ=** intervalo interquartil; **IR=** intervalo de referência; **S_l=** deformação longitudinal.

APÊNDICE C

VALORES DE REFERÊNCIA PARA A DEFORMAÇÃO CIRCUNFERENCIAL POR SEGMENTO EM HAMSTERS

	Média±DP ou Mediana(IIQ)	IR 95%
S_c		
Endocárdica		
Anterior	-20,2±4,8	[-7,5; -32,8]
Ântero lateral	-23,4±5,2	[-9,7; -37,5]
Íntero lateral	-18,1±5,0	[-4,7; -31,1]
Inferior	-16,9±5,7	[-1,6; -32,1]
Septo inferior	-26,0±5,2	[-12,4; -40,3]
Septo anterior	-18,2±4,6	[-5,5; -30,0]
Epicárdica		
Anterior	-9,5(-1,5 -17,2)	[-0,4; -18,5]
Ântero lateral	-10,8±4,1	[-0,4; -21,7]
Íntero lateral	-11,5±3,4	[-2,4; -20,5]
Inferior	-9,5±3,2	[-0,6; -17,8]
Septo inferior	-12,1±3,4	[-2,5; -21,6]
Septo anterior	-8,7±3,1	[-0,4; -16,8]

DP= desvio padrão; **IIQ**= intervalo interquartil; **IR**= intervalo de referência; **S_c**= deformação circunferencial.

APÊNDICE D

VALORES DE REFERÊNCIA PARA A DEFORMAÇÃO RADIAL POR SEGMENTO EM HAMSTERS

	Média±DP ou Mediana(IIQ)	IR 95%
S _r		
Endocárdica		
Anterior	34,9±8,6	[11,2; 57,4]
Ântero lateral	32,7(12,9-47,0)	[0,4; 67,5]
Íntero lateral	40,9±12,2	[8,4; 73,3]
Inferior	41,6±11,9	[10,1; 73,3]
Septo inferior	30,8±10,6	[11,2; 58,6]
Septo anterior	30,1±9,0	[6,3; 53,9]

DP= desvio padrão; **IIQ**= intervalo interquartil; **IR**= intervalo de referência;
S_r= deformação radial.

APÊNDICE E

GRÁFICOS DE DISPERSÃO DE BLAND-ALTMAN. ANÁLISE INTEROBSERVADOR DE PARÂMETROS DE GEOMETRIA DO VENTRÍCULO ESQUERDO EM HAMSTERS

APÊNDICE F

GRÁFICOS DE DISPERSÃO DE BLAND-ALTMAN. ANÁLISE INTEROBSERVADOR PARA O CÁLCULO DA FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO POR DIFERENTES MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE VOLUME EM HAMSTERS

APÊNDICE G

GRÁFICOS DE DISPERSÃO DE BLAND-ALTMAN. ANÁLISE INTEROBSERVADOR PARA A DEFORMAÇÃO ENDOCÁRDICA GLOBAL EM HAMSTERS