

Comparação entre a Ventriculografia Radioisotópica e a Ecocardiografia na Quantificação da Função Sistólica Ventricular Esquerda em Ratos Expostos à Doxorubicina

Comparison between Radionuclide Ventriculography and Echocardiography for Quantification of Left Ventricular Systolic Function in Rats Exposed to Doxorubicin

Luciano Fonseca Lemos de Oliveira,¹ João Lucas O'Connell,² Eduardo Elias Vieira de Carvalho,¹ Érica Carolina Campos Pulici,² Minna Moreira Dias Romano,¹ Benedito Carlos Maciel,¹ Marcus Vinicius Simões¹

Centro de Cardiologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (USP)¹; Universidade Federal de Uberlândia (UFU)², MG - Brasil

Resumo

Fundamento: A ventriculografia radioisotópica (VRI) é um método validado para avaliação da função sistólica do ventrículo esquerdo (FSVE) em pequenos roedores. Contudo, nenhum estudo prévio comparou os resultados obtidos com VRI com os obtidos por outros métodos de imagem neste contexto.

Objetivos: Comparar os resultados de FSVE obtidos por VRI e por ecocardiografia (ECO) em modelo experimental de cardiotoxicidade por doxorubicina (DXR) em ratos.

Métodos: Ratos Wistar machos adultos controles (n = 7) e tratados com DXR (n = 22) em doses acumuladas de 8, 12 e 16 mg/kg, foram avaliados com ECO com equipamento Sonos 5500 Philips (transdutor de 12 MHz) e VRI adquirida em gama-câmara Orbiter-Siemens com colimador *pinhole* de 4 mm de abertura. Após eutanásia, foi realizada a quantificação histopatológica da fibrose miocárdica.

Resultados: Os animais controles apresentaram valores comparáveis na análise da FSVE à ECO e à VRI (83,5 ± 5% e 82,8 ± 2,8%, respectivamente, p > 0,05). Os animais que receberam DXR apresentaram valores menores de FSVE quando comparados aos dos controles (p < 0,05); entretanto, observou-se neste grupo menores valores de FSVE obtidos por VRI (60,6 ± 12,5%) quando comparados aos obtidos pela ECO (71,8 ± 10,1%, p = 0,0004). A análise da correlação entre a FSVE e a fibrose miocárdica mostrou uma correlação moderada quando a FSVE foi estimada com a ECO (r = -0,69, p = 0,0002) e mais forte quando a FSVE foi obtida por VRI (r = -0,79, p < 0,0001). Apenas a VRI apresentou correlação de forma independente com a fibrose miocárdica à análise de regressão múltipla.

Conclusão: A VRI é um método alternativo para avaliação da função ventricular esquerda *in vivo* em pequenos roedores, exibindo comparativamente à ECO melhor correlação com o grau de lesão miocárdica no modelo de cardiotoxicidade por DXR. (Arq Bras Cardiol. 2017; 108(1):12-20)

Palavras-chave: Ventriculografia com Radionuclídeos /métodos; Ecocardiografia / métodos; Função Ventricular Esquerda; Estudo Comparativo; Ratos; Doxorubicina.

Abstract

Background: Radionuclide ventriculography (RV) is a validated method to evaluate the left ventricular systolic function (LVSF) in small rodents. However, no prior study has compared the results of RV with those obtained by other imaging methods in this context.

Objectives: To compare the results of LVSF obtained by RV and echocardiography (ECHO) in an experimental model of cardiotoxicity due to doxorubicin (DXR) in rats.

Methods: Adult male Wistar rats serving as controls (n = 7) or receiving DXR (n = 22) in accumulated doses of 8, 12, and 16 mg/kg were evaluated with ECHO performed with a Sonos 5500 Philips equipment (12-MHz transducer) and RV obtained with an Orbiter-Siemens gamma camera using a pinhole collimator with a 4-mm aperture. Histopathological quantification of myocardial fibrosis was performed after euthanasia.

Results: The control animals showed comparable results in the LVSF analysis obtained with ECHO and RV (83.5 ± 5% and 82.8 ± 2.8%, respectively, p > 0.05). The animals that received DXR presented lower LVSF values when compared with controls (p < 0.05); however, the LVSF values obtained by RV (60.6 ± 12.5%) were lower than those obtained by ECHO (71.8 ± 10.1%, p = 0.0004) in this group. An analysis of the correlation between the LVSF and myocardial fibrosis showed a moderate correlation when the LVSF was assessed by ECHO (r = -0.69, p = 0.0002) and a stronger correlation when it was assessed by RV (r = -0.79, p < 0.0001). On multiple regression analysis, only RV correlated independently with myocardial fibrosis.

Conclusion: RV is an alternative method to assess the left ventricular function in small rodents *in vivo*. When compared with ECHO, RV showed a better correlation with the degree of myocardial injury in a model of DXR-induced cardiotoxicity. (Arq Bras Cardiol. 2017; 108(1):12-20)

Keywords: Radionuclide Ventriculography / methods; Echocardiography / methods; Ventricular Function, Left; Comparative Study; Rats; Doxorubicin.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Marcus Vinicius Simões •

Centro de Cardiologia – Departamento de Clínica Médica - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Avenida Bandeirantes 3900 - CEP 14048-900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil

Email: msimoes@fmrp.usp.br

Artigo recebido em 06/03/16; revisado em 18/03/16; aceito em 28/06/16.

DOI: 10.5935/abc.20160194

Introdução

Nas últimas décadas, métodos de imagem para avaliação *in vivo* de parâmetros funcionais e estruturais cardíacos em pequenos animais têm sido amplamente utilizados tanto no estudo de mecanismos fisiopatológicos de disfunção ventricular em vários modelos de cardiopatia, quanto no desenvolvimento de novas terapias para insuficiência cardíaca (IC).¹⁻⁷ Esses métodos permitem um estudo longitudinal dos animais, aumentando o poder de observação a custos mais reduzidos.

Dentre os parâmetros mensuráveis, a função sistólica do ventrículo esquerdo (FSVE) é uma variável-chave na avaliação do remodelamento miocárdico, grau de disfunção ventricular e prognóstico da doença miocárdica. A ecocardiografia (ECO) tem sido amplamente utilizada para avaliação da função ventricular em humanos e em modelos de cardiopatia por ser uma ferramenta de baixo custo e com rápida obtenção de imagens sem necessidade de isótopos radioativos.^{1,2,8} Entretanto, a avaliação ecocardiográfica, especialmente em pequeno roedores, depende amplamente do avaliador e tem reprodutibilidade interobservador limitada, o que restringe a detecção de alterações discretas.⁹

A ventriculografia radioisotópica (VRI) é uma técnica frequentemente utilizada na prática clínica e que demonstra boa acurácia e níveis elevados de reprodutibilidade em avaliações seriadas para quantificação da FSVE.^{10,11} Além disso, a VRI é considerada por muitos o método padrão-ouro na avaliação da função ventricular, pois representa fielmente os volumes das câmaras ventriculares em cada momento do ciclo cardíaco sem assunções de forma e/ou geometria miocárdica.¹²⁻¹⁴ Entretanto, poucos estudos têm demonstrado sua aplicação em modelos de cardiopatia em pequenos animais.^{15,16}

Embora o emprego da VRI em modelos de cardiopatia experimental em pequenos roedores tenha sido descrita há bastante tempo,^{15,16} não há estudos comparando resultados de VRI com os de outros métodos de imagem *in vivo*. O objetivo do presente estudo foi analisar comparativamente a capacidade da ECO e da VRI em avaliar o desempenho sistólico global do ventrículo esquerdo e correlacionar esses resultados com a gravidade das alterações estruturais cardíacas detectadas pela análise histopatológica em modelo de cardiotoxicidade por antraciclina.

Métodos

Animais experimentais

Após aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da nossa instituição, o estudo foi realizado com 29 ratos Wistar machos, com peso aproximado de 250 g, obtidos do Biotério Central da instituição. Os animais foram mantidos em alojamento climatizado, com acesso livre a água e ração padrão, submetidos a um ritmo de 12 horas de luz/sombra e temperatura controlada. Em todos os procedimentos, foi realizado esforço máximo para evitar sofrimento desnecessário dos animais.

Delineamento geral do estudo

Para alcançarmos uma observação mais ampla da acurácia dos dois métodos de imagem em faixas variáveis de comprometimento da FSVE, utilizamos diferentes doses de infusão intravenosa de doxorrubicina (DXR). Esta abordagem nos permitiu também obter uma dispersão ampla das variáveis investigadas para melhor correlação das alterações da função cardíaca medida *in vivo* e o grau de lesão histológica *in vitro* que serviu como padrão-ouro de lesão miocárdica.

Dessa forma, os animais receberam ao longo de 8 semanas três diferentes doses acumuladas de DXR: D-8 mg: infusão total de 8 mg/kg de DXR através de quatro injeções semanais de 2 mg/kg (n = 8); D-12mg: 12 mg/kg acumulada ao longo de seis injeções semanais de 2 mg/kg (n = 7); D-16mg: 16 mg/kg através de oito injeções semanais de 2 mg/kg (n = 7). Sete animais controles receberam injeções de solução salina ao longo de 8 semanas.

Todos os animais foram submetidos à avaliação não invasiva da FSVE mediante emprego de métodos de imagem *in vivo*, ECO e VRI na condição basal e 2 semanas após o término do período de infusão das respectivas doses de DXR ou salina.

Medicações administradas

O fármaco Adriablastina® RD (cloridrato de doxorrubicina, Pharmacia, Milão, Itália) foi dissolvido em salina (10 mg/5 mL) e infundido por via intravenosa. Uma solução contendo cloridrato de ketamina (Vetbrands, Jacaré, São Paulo, Brasil – 20 mg/kg) e xilazina (Bayer, São Paulo, Brasil – 8 mg/kg) foi administrada por via intramuscular para a indução anestésica antes de cada injeção intravenosa de DXR e da realização dos exames de imagem. Para a eutanásia dos animais, foi utilizada uma sobredose destes anestésicos (40 e 16 mg/kg, respectivamente).

Ecocardiografia

Após sedação e tricotomia da região anterior do tórax, os animais, sob ventilação espontânea, foram posicionados em decúbito lateral esquerdo e avaliados com ecodopplercardiografia com um sistema de ECO bidimensional de alta resolução (Sonos 5500 Philips, Andover, MA, EUA), com transdutor setorial com 12 MHz de frequência. A função ventricular foi avaliada pelo cálculo da fração de encurtamento da área do ventrículo esquerdo, medida a partir do eixo curto do ventrículo. O encurtamento da área foi determinado pela fórmula: $\Delta A = (AD - AS) / AD \times 100$,¹⁷ na qual AD e AS são as áreas na diástole e sístole, respectivamente. A fração de encurtamento de áreas tem se mostrado efetiva na detecção de disfunção sistólica do ventrículo esquerdo em modelos experimentais de infarto do miocárdico em ratos¹⁸⁻²⁰ e traz a vantagem de considerar a imagem bidimensional do ventrículo no eixo curto, em comparação à fração de encurtamento ventricular ($\Delta D\%$), que leva em consideração apenas uma dimensão linear ventricular na diástole e na sístole.

As imagens obtidas foram gravadas e arquivadas para posterior análise *off-line* por observador cego ao grupo de

estudo ao qual o animal pertencia. Todas as medidas foram obtidas pelo mesmo investigador e revisadas por outro, ambos com experiência na obtenção e análise de ECO em pequenos animais.

Ventriculografia radioisotópica

Após a anestesia, foi administrada uma injeção com 75 μg de agente estanho na veia da cauda. Após um intervalo de 15 min, os animais receberam nova injeção na veia da cauda de 15 mCi de pertecnetato de Tc-99m. Imediatamente após a administração do Tc-99m, os animais foram levados à gama-câmara e posicionados em decúbito dorsal sob o detector. Foram implantados três eletrodos na hipoderme dos animais para monitorização eletrocardiográfica, posicionados nos dois membros anteriores e na porção superior do abdômen, como mostra a Figura 1.

A VRI foi realizada com gama-câmara Orbiter-Siemens (Siemens, Erlangen, Alemanha), equipada com um colimador *pinhole* com orifício de abertura de 4 mm. Foram obtidas imagens na projeção oblíqua anterior esquerda em formato *word*, matrizes de 64 por 64 pixels, sincronizadas com a eletrocardiografia (ECG) com janela de aceitação de 20% em torno do valor médio da duração do QRS e com 32 quadros por ciclo cardíaco. Foram adquiridas 200.000 contagens por quadro. A janela de energia simétrica de 20% centrada no fotopico de energia do Tc-99m foi de 140 keV.

Para o processamento das imagens, foi utilizado um programa disponível comercialmente (planar gated blood pool, SMV America) em uma estação de trabalho dedicada (NXT-P, Sopha Medical Vision). Após detecção semiautomática das bordas do ventrículo esquerdo, com auxílio das imagens paramétricas de fase e de amplitude de variação de contagens, uma curva tempo *versus* atividade

foi gerada. A partir da curva, foi calculada a FSVE, expressa em valores percentuais (%), definida como a diferença entre os valores corrigidos para a radiação de fundo das contagens diastólicas e sistólicas finais dividida pelo valor das contagens diastólicas finais (Figura 2).

Histologia

Após a eutanásia dos animais, foi realizada a quantificação da extensão da fibrose miocárdica através da medida da área de colágeno miocárdico. Foram utilizados os corações cortados transversalmente, incluídos em parafina e corados com picrossírius vermelho. Para quantificação do colágeno, foi utilizado o programa Leica QWin Software V 3.2.0 (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, Inglaterra) em conjunto com um microscópio óptico Leica DMR (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanha), videocâmera (Leica DC300F, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Suíça) e um computador *online*. Os valores referentes às áreas de fibrose foram obtidos em relação à área total dos ventrículos esquerdo e direito e do septo, expressos em porcentagem. Foram avaliados 10 campos da parede livre do ventrículo esquerdo.

Análise estatística

Para o cálculo do tamanho da amostra, estabelecemos um intervalo de confiança de 95% (bicaudal) e poder de teste de 90%, assumindo um desvio padrão de 5 e 3 unidades percentuais da FSVE para a ECO e a VRI, respectivamente, valores obtidos em um estudo piloto em animais controles. Desta forma, o tamanho amostral de 22 animais seria adequado para detectarmos uma diferença de 5 unidades ejetivas entre os métodos. O tamanho da amostra foi calculado com a utilização da ferramenta disponível no site eletrônico www.openepi.com.

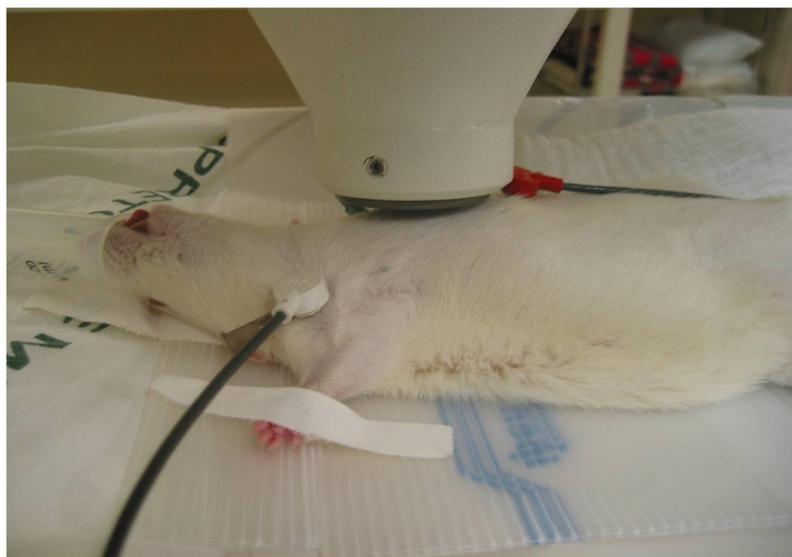


Figura 1 – Posicionamento do animal e dos eletrodos para realização da ventriculografia radioisotópica.

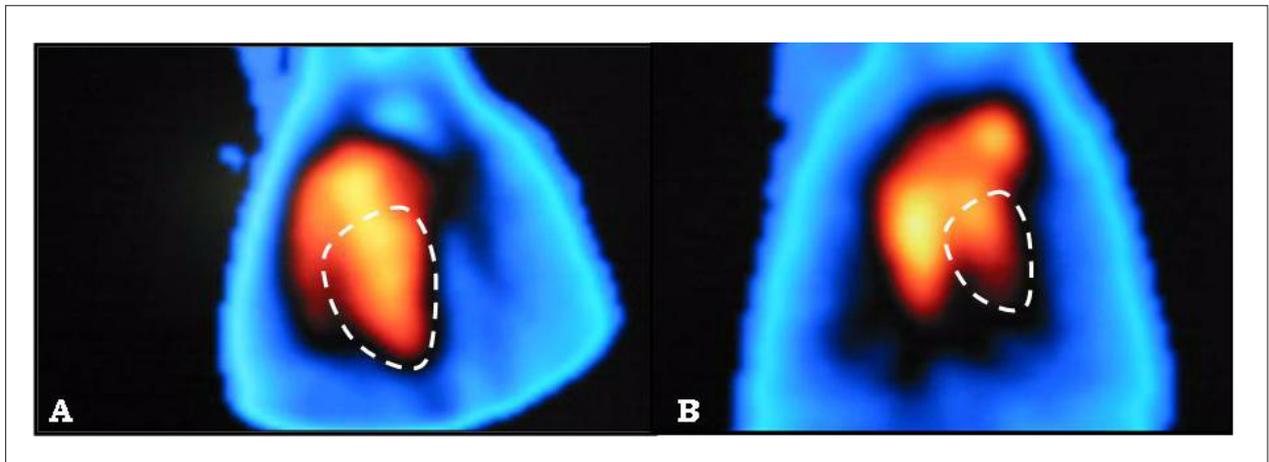


Figura 2 – Imagens do compartimento sanguíneo cardíaco marcado com ^{99m}Tc , na projeção oblíqua anterior esquerda, nos quadros diastólico (A) e sistólico (B), permitindo quantificar a função sistólica ventricular esquerda (FSVE) mediante desenho de regiões de interesse. FSVE = 76%.

Os resultados estão expressos como média e desvio padrão. A distribuição Gaussiana das variáveis foi verificada mediante emprego do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação entre os valores médios de FSVE avaliados pelos métodos, utilizamos o teste *t* de Student pareado. Para comparação entre os valores médios da extensão da fibrose miocárdica entre os animais controles e os animais que receberam DXR, utilizamos o teste *t* de Student não pareado. Para análise de correlação da FSVE obtida pelos métodos de imagem, utilizamos o teste de regressão linear e correlação pelo método dos mínimos quadrados. O método gráfico de Bland-Altman foi utilizado para análise adicional da concordância entre as medidas de FSVE obtidas pelos dois métodos empregados. O teste de regressão linear também foi utilizado para avaliar a correlação entre a FSVE e a área de fibrose.

Todas as análises foram realizadas com o programa GraphPad InStat, versão 3.05, com um nível de significância para as diferenças de 5% ($p < 0,05$, bicaudal).

Resultados

Avaliação da função sistólica do ventrículo esquerdo

A Tabela 1 e a Figura 3 resumem os resultados obtidos.

A análise da FSVE nos animais controles revelou valores comparáveis aos obtidos mediante o emprego da VRI e da ECO bidimensional ($82,8 \pm 2,8\%$ versus $83,5 \pm 5\%$, $p > 0,05$).

A comparação entre os animais controles e animais que receberam DXR mostrou que ambos os métodos de imagem evidenciaram valores de FSVE mais reduzidos no grupo de animais que receberam DXR ($p < 0,005$). Esses animais apresentaram também uma área maior de fibrose quando comparados aos animais controles ($8,7 \pm 3,2\%$ versus $2,3 \pm 1\%$, respectivamente, $p < 0,05$).

Adicionalmente, os animais que receberam DXR exibiram valores significativamente menores de FSVE avaliada pela VRI ($60,6 \pm 12,5\%$) quando comparados aos obtidos com a ECO ($71,8 \pm 10,1\%$, $p < 0,05$).

Análise de correlação e de concordância

Considerando toda a amostra estudada (incluindo controles e animais expostos à DXR), medidas individuais da FSVE obtidas por VRI mostraram uma correlação positiva moderada e significativa com as obtidas por ECO ($r = 0,72$, $p < 0,0001$) (Figura 4).

A análise de concordância entre as medidas com emprego do método gráfico de Bland-Altman (Figura 5) mostrou uma diferença média (VRI - ECO) de $-7,6 \pm 10,3\%$, com limites de concordância de $-28,1\%$ a $12,9\%$. Na análise da nuvem de dispersão, observou-se uma correlação positiva significativa ($r = 0,47$, $p = 0,01$) entre os valores da média das medidas obtidas pela VRI e ECO plotadas contra a diferença entre as mesmas medidas, indicando que os métodos não exibem boa concordância para diferentes faixas de valores de FSVE. Esse resultado sugere que a VRI estima valores de FSVE inferiores aos estimados pela ECO em animais com uma função sistólica global mais comprometida.

Correlação entre os métodos de avaliação funcional in vivo e análise histológica

Pela aplicação da regressão linear, foi observada uma moderada correlação negativa e significativa entre a FSVE medida pela ECO e a área de colágeno acumulado determinada na análise histológica ($r = -0,69$, $p = 0,0002$). Foi verificada uma correlação negativa significativa e mais forte entre a FSVE avaliada pelo uso da VRI e a área de colágeno acumulado ($r = -0,79$, $p < 0,0001$) (Figura 6). Mediante análise de regressão múltipla, na qual ambos os métodos de imagem foram inseridos no modelo de regressão, apenas a função ventricular medida pela VRI correlacionou-se de forma independente com a porcentagem de colágeno acumulado no miocárdio.

Discussão

Em muitos modelos experimentais de cardiopatia em pequenos animais, a avaliação seriada da FSVE é o parâmetro mais amplamente empregado para acompanhar as mudanças

Tabela 1 – Sumário dos resultados em média e desvio-padrão obtidos na avaliação da função sistólica do ventrículo esquerdo pela ecocardiografia e pela ventriculografia radioisotópica nos animais controles e nos que receberam doxorubicina

	ECO (%)	VRI (%)	Fibrose (%)
DXR (n=22)	71,8±10,1	60,6±12,5	8,7±3,2
Controle (n=7)	83,5±5	82,8±2,8	2,3±1
p	0,002	<0,0001	<0,0001

ECO: ecocardiografia; VRI: ventriculografia radioisotópica; DXR: doxorubicina.

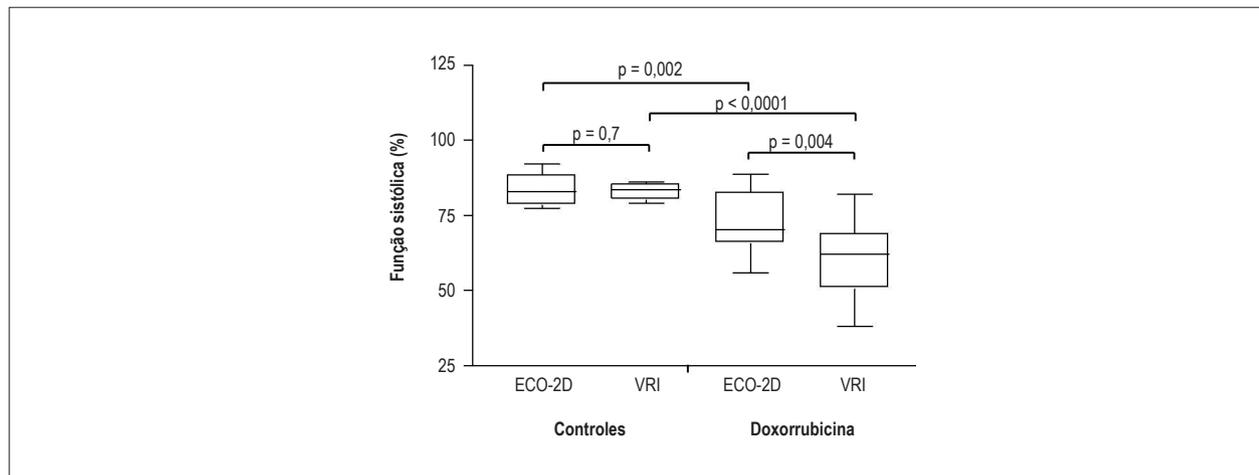


Figura 3 – Gráfico evidenciando a função sistólica ventricular esquerda obtida por ecocardiografia bidimensional (ECO-2D) e ventriculografia radioisotópica (VRI) em animais do grupo controle e animais que receberam doxorubicina.

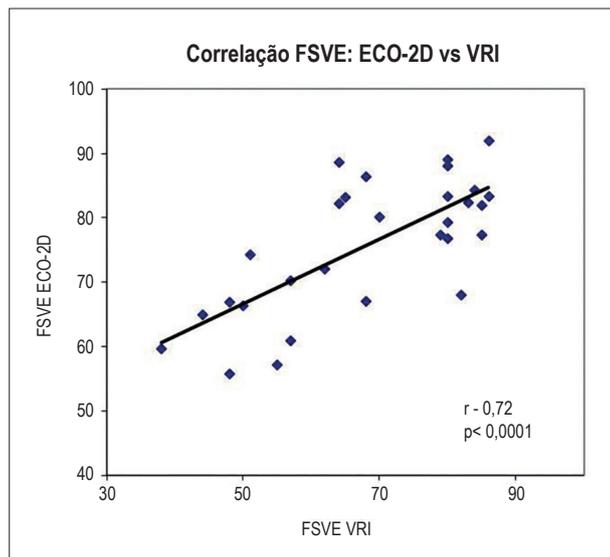


Figura 4 – Gráfico de correlação entre a função sistólica ventricular esquerda (FSVE) avaliada por ecocardiografia bidimensional (ECO-2D) e ventriculografia radioisotópica (VRI) nos animais que receberam doses diferentes de doxorubicina ($r = 0,72$, $p < 0,0001$). (*Teste estatístico realizado: análise de regressão linear e coeficiente de correlação de Pearson)

na função miocárdica decorrente da evolução da doença ou do impacto da intervenção medicamentosa.⁴

No presente estudo, mediante o emprego de métodos de imagens *in vivo*, avaliamos a FSVE em animais controles e animais submetidos a um modelo experimental de cardiotoxicidade por DXR. Isso nos permitiu comparar a ECO bidimensional e a VRI na quantificação da FSVE em animais com diferentes graus de comprometimento da FSVE, assim como correlacionar esses dados com a quantificação da área de colágeno tecidual na análise histopatológica, considerada padrão-ouro na avaliação do grau de lesão miocárdica neste modelo de cardiotoxicidade.

Nossos resultados mostram que os valores de FSVE obtidos por VRI e ECO eram semelhantes nos animais controles. Entretanto, nos animais com disfunção ventricular consequente à infusão cumulativa de DXR, os valores de FSVE obtidos por VRI foram menores quando comparados aos obtidos por ECO.

Adicionalmente, observamos uma correlação moderada significativa entre os resultados da FSVE medidos pela VRI e pela ECO. Entretanto, essa forma de análise não demonstra necessariamente a concordância entre os dois métodos.²¹⁻²³ A análise gráfica de Bland-Altman mostrou que apesar dos dados exibirem uma correlação significativa na análise

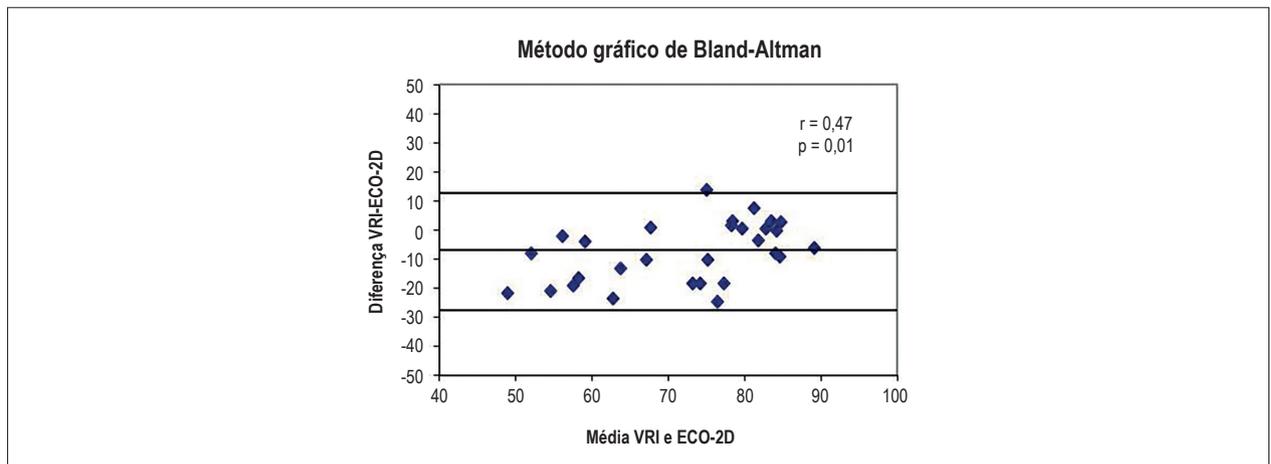


Figura 5 – Gráfico de Bland-Altman evidenciando fraca concordância entre os métodos de imagem apresentando menores valores observados pela ventriculografia radioisotópica (VRI) em animais com a função sistólica do ventrículo esquerdo rebaixada.

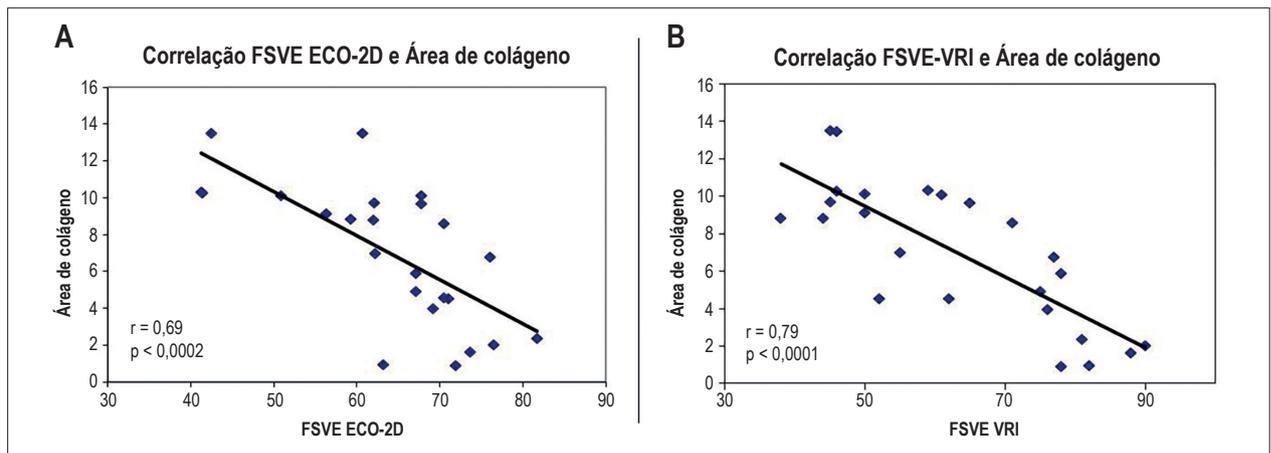


Figura 6 – Gráfico de correlação entre os valores médios da função sistólica ventricular esquerda (FSVE) avaliada por (A) ecocardiografia bidimensional (ECO-2D) e (B) ventriculografia radioisotópica (VRI) e a porcentagem de colágeno acumulado à análise histológica nos animais que receberam infusão de 8, 12 e 16 mg/kg de doxorubicina.

de regressão, as medidas não foram concordantes para diferentes faixas de valores da FSVE. Esta análise mostra que além de limites de concordância muito amplos, em animais com função sistólica mais deprimida, o ECO avalia valores relativamente mais elevados de FSVE do que a VRI.

No conjunto, esses resultados indicam uma maior sensibilidade da VRI, comparativamente à ecocardiografia, para detectar disfunção sistólica no ventrículo esquerdo neste modelo experimental.

Essa interpretação dos dados é reforçada pelos resultados da análise de correlação entre os valores de FSVE obtidos por cada método e a extensão de acúmulo de colágeno, sendo este um índice do grau de lesão miocárdica neste modelo. Por esta análise, os resultados da VRI alcançaram correlação mais forte do que a obtida com a ECO, sendo a VRI a única a exibir correlação independente num modelo de regressão múltipla. Esse conjunto de dados reforça a impressão de que a VRI fornece uma avaliação mais acurada da FSVE.

Embora não exista nenhum trabalho no cenário experimental comparando ambos os métodos de imagem, estudos clínicos prévios são concordantes com nossos resultados ao mostrarem que embora a ecocardiografia e a VRI apresentem uma boa correlação geral para mensuração da FSVE, ambos os métodos apresentam apenas um grau moderado de concordância.²⁴⁻²⁶

Em um estudo em pacientes pós-IAM, Ray et al. (1995) demonstraram uma diferença média na avaliação da FSVE entre a VRI e a ECO de $-8 \pm 10\%$, com limites de concordância de -28% a $+12\%$,²⁷ resultados que espelham em certo grau os descritos neste trabalho. Outro estudo em pacientes pós-IAM também demonstrou uma superestimação da FSVE quando avaliada pela ecocardiografia em comparação à VRI e com amplos limites de concordância.²⁸ Bellenger et al.,²⁹ ao estudarem pacientes com IC estável, demonstraram uma diferença significativa da FSVE avaliada pelos dois métodos.

Evidenciaram ainda uma moderada correlação ($r = 0,44$), mas com amplos limites de concordância entre eles, de -45% a 13%.

A baixa concordância entre as duas técnicas de avaliação da FSVE também foi evidenciada em pacientes portadores de marca-passo permanente,³⁰ e em pacientes após transplante cardíaco,³¹ estudos nos quais a ecocardiografia superestimou a FSVE em comparação à VRI e à ressonância nuclear magnética cardíaca.

Essas diferenças entre as técnicas, que já foram bem observadas no cenário clínico, podem se acentuar no cenário experimental dadas as diferenças mecânicas e geométricas do miocárdio de pequenos animais. Cabe ressaltar ainda que a contribuição do encurtamento apical em roedores possa ser diferente daquela observada em humanos, o que comprometeria ainda mais as assunções geométricas adotadas na ECO para estimativas de volumes.³²

A ECO é o método de imagem mais amplamente utilizado em grandes estudos clínicos e trabalhos experimentais, mas é dependente de assunções geométricas miocárdicas para estimativa da FSVE. Isso se torna desvantajoso em várias situações, como no caso da dilatação progressiva e consequente alteração geométrica do ventrículo esquerdo na IC.³³ Neste sentido, os métodos biplanares são considerados mais precisos que o modo M; entretanto, continuam a extrapolar as quantificações de volumes ventriculares através de assunções geométricas da cavidade do ventrículo esquerdo.²⁹ Em modelos animais experimentais, principalmente roedores, outro fator limitante da ECO bidimensional na quantificação da função ventricular é a perda da qualidade de imagem em janelas apicais, gerando pobre definição do endocárdio e dificultando a medida do encurtamento da cavidade do ventrículo esquerdo.³⁴⁻³⁶

É plausível supor que esta limitação na estimativa acurada da FSVE em cavidades ventriculares dilatadas e com conformação mais esférica, concomitante à disfunção sistólica mais grave, seja a principal explicação dos resultados obtidos no presente estudo. Vale ressaltar que para estimar a FEVE, a VRI se baseia na variação de contagens diretamente proporcionais ao volume de sangue na cavidade ventricular, sendo, portanto, um método que não sofre influência significativa das modificações de forma e geometria da cavidade ventricular esquerda. Em contrapartida, as avaliações obtidas com a ECO bidimensional se baseiam em medidas planares e são altamente dependentes da conformação geométrica da cavidade do ventrículo esquerdo. Sendo assim, sofrem alterações da sua acurácia em situações com disfunção ventricular mais graves nas quais o ventrículo esquerdo assume conformação mais esférica além de apresentar outras deformações de formato em sua cavidade. O advento da ECO tridimensional e sua disponibilidade em novos equipamentos dedicados a pequenos animais provavelmente trará uma melhora substancial na acurácia da estimativa da FSVE pelo método ecocardiográfico, ao permitir uma aferição direta dos volumes das cavidades ventriculares.³⁴⁻³⁶

É importante lembrar que a VRI sofre várias limitações técnicas, como baixa resolução espacial, necessidade de correções de fundo, sobreposição de estruturas, erros de atenuação e necessidade de manipulação de radiação ionizante.³⁷ A maior limitação no emprego de uma gama-câmara de uso clínico para aquisições de imagens cintilográficas

de pequenos roedores é a resolução espacial limitada. De fato, como as estruturas de pequenos roedores a serem avaliadas com imagem são de ordem de grandeza 10 vezes menor que os órgãos humanos, a resolução espacial de um estudo cintilográfico convencional (em torno de 1,0 cm) deveria ser aumentada proporcionalmente para 1 mm. No nosso estudo, a utilização de um colimador *pinhole* com abertura de 4 mm foi suficiente para aumentar consideravelmente a resolução espacial da imagem, com a devida visualização da separação entres os ventrículos direito e esquerdo (Figura 2) e manutenção do tempo de aquisição da imagem de 15 min, ainda adequado para um estudo experimental.

Por outro lado, é fundamental salientar que apesar do elevado desempenho da VRI na medição da FSVE, este método de imagem é mais dispendioso e não fornece informações sobre outros parâmetros de remodelamento do ventrículo esquerdo como diâmetros, espessura de paredes e alterações do aparelho valvar. Portanto, acreditamos que a VRI possa vir a ser uma ferramenta adicional aliada à ECO em uma avaliação mais completa dos modelos de cardiopatia em pequenos animais.

Limitações do estudo

Algumas limitações deste estudo devem ser apontadas. Por exemplo, não foi possível quantificar a fração de ejeção do ventrículo esquerdo pela ECO através do método biplanar de Simpson, devido à limitação na resolução do endocárdio nas imagens apicais dos animais. É provável que o emprego de um equipamento de ECO de alta resolução e um transdutor de 30 MHz, dedicado à obtenção e análise de imagens de pequenos roedores, poderia ter obtido resultados mais fidedignos. Da mesma forma, a eventual utilização da ECO tridimensional poderia ter permitido a medida de volumes ventriculares e proporcionado uma medida mais acurada da FSVE. Vale também ressaltar que nosso estudo não incluiu o uso de um método de imagem padrão-ouro *in vivo* para medir a FSVE, como a ressonância magnética cardíaca.

Conclusão

A VRI é um método alternativo para avaliação do grau de disfunção ventricular esquerda em pequenos roedores *in vivo*, exibindo comparativamente à ECO uma melhor correlação com o grau de lesão miocárdica avaliada pela histopatologia no modelo de cardiotoxicidade por DXR.

Nossos resultados sugerem que embora a ECO seja uma opção mais disponível, de fácil emprego e baixo custo, a VRI possa ter, em comparação, um melhor desempenho, especialmente em medidas sequenciais da FSVE em modelos de cardiopatia com modificações da geometria ventricular esquerda.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: O'Connell JL, Pulici ECC, Romano MMD, Maciel BC, Simões MV; Obtenção de dados: Oliveira LFL, O'Connell JL, Carvalho EEV, Pulici ECC, Romano MMD; Análise e interpretação dos dados: Oliveira LFL, O'Connell JL, Carvalho EEV, Pulici ECC, Simões MV; Análise estatística: Oliveira LFL, Simões MV; Obtenção de financiamento: Simões MV; Redação do manuscrito: Oliveira

LFL, Carvalho EEV, Simões MV; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Oliveira LFL, Romano MMD, Maciel BC, Simões MV.

Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Referências

1. 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;287(5):H2049-53.
2. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LA, Oliveira SA Jr, Campos DH, Lima AR, et al. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *J Appl Physiol* (1985). 2011;111(2):543-51.
3. Desrois M, Kober F, Lan C, Dalmasco C, Cole M, Clarke K, et al. Effect of isoproterenol on myocardial perfusion, function, energy metabolism and nitric oxide pathway in the rat heart - a longitudinal MR study. *NMR Biomed*. 2014;27(5):529-38.
4. Franken NA, Camps JA, van Ravels FJ, van der Laarse A, Pauwels EK, Wondergem J. Comparison of in vivo cardiac function with ex vivo cardiac performance of the rat heart after thoracic irradiation. *Br J Radiol*. 1997;70(838):1004-9.
5. Croteau E, Benard F, Cadorette J, Gauthier ME, Aliaga A, Bentourkia M, et al. Quantitative gated PET for the assessment of left ventricular function in small animals. *J Nucl Med*. 2003;44(10):1655-61.
6. Maskali F, Franken PR, Poussier S, Tran N, Vanhove C, Boutley H, et al. Initial infarct size predicts subsequent cardiac remodeling in the rat infarct model: an in vivo serial pinhole gated SPECT study. *J Nucl Med*. 2006;47(2):337-44.
7. Oliveira LF, Mejia J, Carvalho EE, Lataro RM, Frassetto SN, Fazan R Jr, et al. Myocardial infarction area quantification using high-resolution SPECT images in rats. *Arq Bras Cardiol*. 2013;101(1):59-67.
8. de Oliveira LF, Romano MM, de Carvalho EE, Cabeza JM, Salgado HC, Fazan Junior R, et al. Histopathological correlates of global and segmental left ventricular systolic dysfunction in experimental chronic Chagas cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(1):pii: e002786.
9. Yu EH, Sloggett CE, Iwanochko RM, Rakowski H, Siu SC. Feasibility and accuracy of left ventricular volumes and ejection fraction determination by fundamental, tissue harmonic, and intravenous contrast imaging in difficult-to-image patients. *J Am Soc Echocardiogr*. 2000;13(3):216-24.
10. Wackers FJ, Berger HJ, Johnstone DE, Goldman L, Reduto LA, Langou RA, et al. Multiple gated cardiac blood pool imaging for left ventricular ejection fraction: validation of the technique and assessment of variability. *Am J Cardiol*. 1979;43(6):1159-66.
11. Upton MT, Rerych SK, Newman GE, Bounous EP Jr, Jones RH. The reproducibility of radionuclide angiographic measurements of left ventricular function in normal subjects at rest and during exercise. *Circulation*. 1980;62(1):126-32.
12. Ishibashi M, Yoshioka F, Umezaki N, Morita S. Assessment of cardiac function using radionuclide techniques--theory, technical considerations and clinical application. *Kurume Med J*. 1991;38(2):93-107.
13. Rocco TP, Dilsizian V, Fischman AJ, Strauss HW. Evaluation of ventricular function in patients with coronary artery disease. *J Nucl Med*. 1989;30(7):1149-65.
14. Hains AD, Al-Khawaja I, Hinge DA, Lahiri A, Raftery EB. Radionuclide left ventricular ejection fraction: a comparison of three methods. *Br Heart J*. 1987;57(3):242-6.
15. Pieri P, Fischman AJ, Ahmad M, Moore RH, Callahan RJ, Strauss HW. Cardiac blood-pool scintigraphy in rats and hamsters: comparison of five radiopharmaceuticals and three pinhole collimator apertures. *J Nucl Med*. 1991;32(5):851-5.
16. McIntosh GH, Barnden LR, Buttfield IH, Charnock JS. Gated blood-pool studies of cardiac function in the rat and marmoset. *J Nucl Med*. 1983;24(8):728-31.
17. Solomon SD, Greaves SC, Rayan M, Finn P, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Temporal dissociation of left ventricular function and remodeling following experimental myocardial infarction in rats. *J Card Fail*. 1999;5(3):213-23.
18. Zornoff LA, Paiva SA, Minicucci MF, Spadaro J. Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model. *Arq Bras Cardiol*. 2009;93(4):434-40, 426-32.
19. Minicucci MF, Azevedo PS, Ardisson LP, Okoshi K, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Relevance of the ventricular remodeling pattern in the model of myocardial infarction in rats. *Arq Bras Cardiol*. 2010;95(5):635-9.
20. Antonio EL, Serra AJ, dos Santos AA, Vieira SS, Silva JM, Yoshizaki A, et al. Are there gender differences in left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats? *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2015;30(1):70-6.
21. Bookbinder MJ, Panosian KJ. Using the coefficient of correlation in method-comparison studies. *Clin Chem*. 1987;33(7):1170-6.
22. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;1(8476):307-10.
23. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res*. 1999;8(2):135-60.
24. Folland ED, Parisi AF, Moynihan PF, Jones DR, Feldman CL, Tow DE. Assessment of left ventricular ejection fraction and volumes by real-time, two-dimensional echocardiography: a comparison of cineangiographic and radionuclide techniques. *Circulation*. 1979;60(4):760-6.
25. Quinones MA, Waggoner AD, Reduto LA, Nelson JG, Young JB, Winters WL Jr, et al. A new, simplified and accurate method for determining ejection fraction with two-dimensional echocardiography. *Circulation*. 1981;64(4):744-53.
26. Starling MR, Crawford MH, Sorensen SG, Levi B, Richards KL, O'Rourke RA. Comparative accuracy of apical biplane cross-sectional echocardiography and gated equilibrium radionuclide angiography for estimating left ventricular size and performance. *Circulation*. 1981;63(5):1075-84.
27. Ray SG, Metcalfe MJ, Oldroyd KG, Pye M, Martin W, Christie J, et al. Do radionuclide and echocardiographic techniques give a universal cut off value for left ventricular ejection fraction that can be used to select patients for treatment with ACE inhibitors after myocardial infarction? *Br Heart J*. 1995;73(5):466-9.
28. Jensen-Urstad K, Bouvier F, Hojer J, Ruiz H, Hulting J, Samad B, et al. Comparison of different echocardiographic methods with radionuclide imaging for measuring left ventricular ejection fraction during acute myocardial infarction treated by thrombolytic therapy. *Am J Cardiol*. 1998;81(5):538-44.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAEPA.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de João Lucas O'Connell pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

29. Bellenger NG, Burgess MI, Ray SG, Lahiri A, Coats AJ, Cleland JG, et al. Comparison of left ventricular ejection fraction and volumes in heart failure by echocardiography, radionuclide ventriculography and cardiovascular magnetic resonance; are they interchangeable? *Eur Heart J*. 2000;21(16):1387-96.
30. Thackray SD, Wright GA, Witte KK, Nikitin NP, Tweddel AC, Clark AL, et al. The effect of ventricular pacing on measurements of left ventricular function: a comparison between echocardiographic methods and with radionuclide ventriculography. *Eur J Echocardiogr*. 2006;7(4):284-92.
31. Bellenger NG, Marcus NJ, Rajappan K, Yacoub M, Banner NR, Pennell DJ. Comparison of techniques for the measurement of left ventricular function following cardiac transplantation. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2002;4(2):255-63.
32. Liu W, Ashford MW, Chen J, Watkins MP, Williams TA, Wickline SA, et al. MR tagging demonstrates quantitative differences in regional ventricular wall motion in mice, rats, and men. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(5):H2515-21.
33. Teichholz LE, Kreulen T, Herman MV, Gorlin R. Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence of absence of asynergy. *Am J Cardiol*. 1976;37(1):7-11.
34. Dawson D, Lygate CA, Saunders J, Schneider JE, Ye X, Hulbert K, et al. Quantitative 3-dimensional echocardiography for accurate and rapid cardiac phenotype characterization in mice. *Circulation*. 2004;110(12):1632-7.
35. 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;301(5):H1765-80.
36. Qin X, Wang S, Shen M, Zhang X, Lerakis S, Wagner MB, et al. 3D in vivo imaging of rat hearts by high frequency ultrasound and its application in myofiber orientation wrapping. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng*. 2015;9419. pii: 941906.
37. Corbett JR, Akinboboye OO, Bacharach SL, Borer JS, Botvinick EH, DePuey EG, et al; Quality Assurance Committee of the American Society of Nuclear Cardiology. Equilibrium radionuclide angiocardiology. *J Nucl Cardiol*. 2006;13(6):e56-79.