

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

**CESARIANA E SUA IMPLICAÇÃO NA VIABILIDADE
NEONATAL: ESTUDO DA TOXICIDADE ANESTÉSICA E
NÍVEIS DE CORTISOL NA ESPÉCIE CANINA**

Renatha Almeida de Araújo
Médica Veterinária

2024

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**CESARIANA E SUA IMPLICAÇÃO NA VIABILIDADE
NEONATAL: ESTUDO DA TOXICIDADE ANESTÉSICA E
NÍVEIS DE CORTISOL NA ESPÉCIE CANINA**

Dicante: Renatha Almeida de Araújo

Orientadora: Profa. Dra. Maricy Apparício Ferreira

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias –
UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como
parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Medicina Veterinária.

2024

A663c Araújo, Renatha Almeida de
Cesariana e sua implicação na viabilidade neonatal : Estudo da toxicidade anestésica e níveis de cortisol na espécie canina / Renatha Almeida de Araújo. -- Jaboticabal, 2024
75 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal
Orientadora: Maricy Apparício Ferreira

1. Obstetria veterinária. 2. Cesariana. 3. Farmacologia veterinária.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CESARIANA E SUA IMPLICAÇÃO NA VIABILIDADE NEONATAL: ESTUDO DA TOXICIDADE ANESTÉSICA E NÍVEIS DE CORTISOL NA ESPÉCIE CANINA

AUTORA: RENATHA ALMEIDA DE ARAÚJO

ORIENTADORA: MARICY APPARÍCIO FERREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Medicina Veterinária, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARICY APPARÍCIO FERREIRA (Participação Presencial)
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal / FMVZ UNESP Botucatu

Prof. Dr. RICARDO ANDRADE FURTADO (Participação Virtual)
UNIFRAN / Franca/SP

Profa. Dra. BEATRICE INGRID MACENTE (Participação Presencial)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Profa. Dra. ANNELESE CARLA CAMPESINI DOS SANTOS (Participação Presencial)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Prof. Dr. WALTER HEINZ FERINGER JUNIOR (Participação Virtual)
Universidade de Araraquara (UNIARA) / Araraquara/SP

Documento assinado digitalmente



BEATRICE INGRID MACENTE
Data: 01/02/2024 11:17:52-0300
Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Documento assinado digitalmente



ANNELESE CARLA CAMPESINI DOS SANTOS
Data: 01/02/2024 09:44:35-0300
Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Documento assinado digitalmente



WALTER HEINZ FERINGER JUNIOR
Data: 31/01/2024 15:23:43-0300
Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Jaboticabal, 29 de janeiro de 2024

Documento assinado digitalmente



MARICY APPARÍCIO FERREIRA
Data: 31/01/2024 15:12:42-0300
Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Documento assinado digitalmente



RICARDO ANDRADE FURTADO
Data: 31/01/2024 15:00:00-0300
Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Renatha Almeida de Araújo – Nascida na cidade de Porto Alegre – RS, em 07 de setembro de 1985, portadora do RG 43459780-6 SSP/SP. Médica Veterinária graduada pela Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal, com início em março de 2004 e término em março de 2009. Ingressou no programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica, na FCAV-Unesp – Jaboticabal, em agosto de 2010, obtendo, em 2012 o Título de Mestre. Iniciou o Doutorado no ano de 2019, desenvolvendo pesquisa na área de farmacologia aplicada a obstetrícia e neonatologia veterinária. Tem experiência na área de Medicina Veterinária, farmacologia e toxicologia.

“Tenho sangrado demais, tenho chorado
pra cachorro. Ano passado eu morri
mas esse ano eu não morro!”

Belchior

Dedico este trabalho à Pietra, minha filha, e
minha minha pessoa favorita no universo.
Nem nos meus planos mais otimistas eu
poderia sonhar com a pessoa maravilhosa
que eu teria a honra de criar!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais que possibilitaram que, durante toda minha trajetória escolar e acadêmica, minha dedicação e preocupação se resumissem a me tornar uma boa profissional. Ao meu pai, Irapuan, veterinário, que mesmo jurando que não queria que eu seguisse seus passos, sempre esteve ao meu lado apoiando minhas escolhas. À minha mãe, Simone, pelo exemplo de uma vida inteira entregue à educação, que me inspira todos os dias a ser uma mulher forte, uma mãe devota e uma profissional de quem ela se orgulhe. Vocês são a base de tudo! Amo vocês!

Agradeço ao meu marido, Fred, pelos mais de 18 anos de caminhada ao meu lado, por todo suporte, e por estar presente suprimindo minhas inúmeras ausências com a nossa filha, nossa família, nossos animais, e nossa casa, nas madrugadas, finais de semanas, feriados, comemorações e na rotina do dia a dia em que eu não pude estar ou me fazer presente. Além de ajudar a carregar gestante, limpar cocô, buscar compressa, aquecer filhote, se preocupar se eu bebi água, comi direito, se tem coca zero, se tem chocolate, e por perder umas boas madrugadas auxiliando no operacional desde trabalho. Te amo, Bem!

Agradeço à Pietra, minha filha, minha mini parça! Que tanto foi exigida durante os longos anos pelos quais este trabalho se estendeu. Por toda a compreensão, mesmo sentindo minha falta, mesmo precisando mais da minha presença, encarando nossos desafios com maturidade, muito amor e se seu inocente incentivo (“Faltam quantos por cento pra acabar?”), que foi o combustível para que eu chegasse até aqui. Te amo, minha linda! A mamãe é muito sortuda por ter você

Agradeço à minha família estendida, ao meu padasto Cícero, meus sogros Angela e Flávio, aos cunhados Érika, Gian, Verônica e Rafael, aos meus sobrinhos Heitor e Enrico pela compreensão com as minhas diversas ausências e por todo apoio. À queridíssima Soninha, agregada da nossa família, que há 35 anos nos brinda com sua alegria e amizade. E à minha irmã,

de outra barriga, Denise (Maionese) que por tantas vezes me resgatou e me fez acreditar que tudo ia dar certo.

Agradeço aos meus filhos de quatro patas que se foram, Pankeka, Supla e Kylie de quem vou sentir saudades eternamente. E agradeço aos que chegaram e amenizaram a tristeza das partidas. Às gatas Chilli e Bombom, que me fizeram virar gateira. À Marmita, minha capivara terrorista, ao Lupin, o lobo mais bobo que já existiu, e à Pitaya, minha Titizinha que nunca errou na vida. São eles que enchem meus dias de vida, alegria, muita bagunça, trabalho e pelos!

Agradeço à nossa equipe de trabalho, que esteve junta em tantas madrugadas e final de semana de trabalho árduo, por correrem a cada chamado de cesária. Às pos-graduandas Samara, Daniella (Pãozinha) pela parceria, pelas alegrias e lágrimas compartilhadas; aos IC João, Jaque e Mel por toda dedicação; a querida Marina que mesmo não participando diretamente deste trabalho auxiliou por diversas vezes nos cuidados com as gestantes e especialmente com os neonatos; a Ane Milaré, membro honorário da equipe, que tanto nos socorreu fosse na cirurgia, fosse na anestesia.

Agradeço em especial à minha orientadora, Profa. Dra. Maricy Apparício pelo incentivo ao meu recomeço na Veterinária, que me fez acreditar que era possível mesmo frente a dificuldades. E em sua figura agradeço também a todos os professores que passaram pela minha vida e, cada um com sua fagulha, despertaram em mim a vontade de saber mais e ser melhor.

Agradeço à toda a equipe do HV, residentes, estagiários funcionários e professores, tanto da Obstetrícia quanto de outros setores que sempre estiveram dispostos a auxiliar neste trabalho, em especial à equipe do Laboratório de Patologia clínica, pelo processamento das amostras e à farmácia pela agilidade no atendimento que tanto otimizaram nosso dia a dia.

Agradeço aos tutores e criadores que confiaram em nosso trabalho e aceitaram que seus animais participassem deste projeto. E por fim, agradeço aos animais que estiveram neste estudo servindo à ciência e ao desenvolvimento deste trabalho. Foi incrível vivenciar cada gestação, especialmente das queridas que estiveram hospedadas em minha casa no pré

e pós-parto. Foi uma experiência emocionante que eu levarei por toda a vida, muito além dos resultados da pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1- Considerações gerais.....	3
1. Introdução.....	3
2. Objetivos.....	4
3. Revisão de literatura.....	4
3.1. Ciclo estral	4
3.2. Gestação	5
3.3. Placenta.....	5
3.4. Mecanismos de transferência placentária	6
3.5. Circulação fetal	7
3.6. Alterações anátomo-fisiológicas decorrentes da gestação e sua influência no metabolismo de fármacos	8
3.7. Parto	12
3.8. Particularidades de fetos, neonatos e adultos	15
4. Farmacologia e terapêutica perinatal.....	18
4.1. Toxicologia do desenvolvimento.....	20
4.2. Exigências de segurança	22
4.3. Potencial Tóxico dos Medicamentos na Gestação e Lactação	26
4.4. Fármacos mais utilizados na gestação em cadelas	28
5. Considerações finais.....	34
6. Referências.....	34
 CAPÍTULO 2- Application of the micronucleus assay for evaluating toxicity in canine elective cesarean section procedures employing two anesthetic protocols	 46
Abstract.....	46
1. Introduction	46
2. Material and methods	48
2.1. Animals	48
2.2. Owners.....	48
2.3. Experimental protocol	48
2.4. Selection criteria.....	49

2.5. Neonatal evaluation	49
2.6. Toxicity evaluation	50
2.7. Statistical Analysis.....	51
3. Results.....	51
4. Discussion	52
5. Conclusion	54
6. References	54
Annex 1.....	58

CAPÍTULO 3- Comparative evaluation of amniotic cortisol concentration in elective and therapeutic cesarean sections..... 60

Abstract.....	60
1. Introduction	60
2. Material and methods	62
2.1. Ethics in the use of animals.....	62
2.2. Animals	62
2.3. Selection Criteria	62
2.4. Surgical Procedure and Neonatal Management	63
2.5. Sample Collection	63
2.6. Analysis of Fetal Fluids and Maternal Blood	64
2.7. Statistical Analysis	64
3. Results.....	65
3.1. Amniotic Cortisol and Type of Delivery	65
3.2. Meconium	65
3.3. Neonatal Viability	66
3.4. Birth Order and Litter Size	67
3.5. Maternal Blood	67
4. Discussion	68
5. Conclusion	71
6. References	71

CESARIANA E SUA IMPLICAÇÃO NA VIABILIDADE NEONATAL: ESTUDO DA TOXICIDADE ANESTÉSICA E NÍVEIS DE CORTISOL NA ESPÉCIE CANINA

RESUMO: O estudo objetivou avaliar a segurança de dois protocolos anestésicos aplicados a cesarianas, investigando o potencial de toxicidade para os neonatos, de cada um deles, a partir da padronização e aplicação de ensaios de micronúcleo com sangue periférico. E determinar a concentração sérica de cortisol no sangue materno estabelecendo correlação com o cortisol amniótico para avaliação de maturidade e estresse fetal em filhotes caninos nascidos de cesarianas eletivas em comparação àqueles nascidos de cesarianas com indicação terapêutica para resolução de distocias. O trabalho consistiu em dois experimentos. No primeiro adaptamos a metodologia ensaio de micronúcleo para investigar os efeitos celulares de substâncias aplicadas em cães durante o período perinatal e utilizamos a técnica para avaliar a toxicidade de dois protocolos anestésicos aplicados a cadelas gestantes. Foram utilizadas 14 cadelas no terço final da gestação e suas ninhadas (62 filhotes), divididas em 3 grupos. O primeiro grupo, composto por 6 animais, foi destinado à adaptação da técnica. As 8 cadelas restantes foram aleatoriamente distribuídas em 2 grupos: Lidocaína e Ropivacaína, recebendo indução anestésica com 3 mg kg⁻¹ de propofol e manutenção com vaporização de isoflurano. No grupo da Lidocaína, a anestesia epidural foi administrada com lidocaína 2% na dose de 2 mg kg⁻¹; no grupo da Ropivacaína, foi administrado 1,5 mg kg⁻¹ de ropivacaína a 1%. Durante a fase de adaptação do protocolo de avaliação, os animais responderam consistentemente à exposição ao procedimento anestésico. Não foi observado efeito genotóxico nem citotóxico em nenhum dos grupos. No segundo experimento, 30 cadelas (22 submetidas a cesarianas eletivas e 8 a cesarianas terapêutica) e suas ninhadas (114 filhotes) foram avaliadas. Não foi observada correlação entre o tipo de parto e os níveis de cortisol ou progesterona no sangue materno, porém o distress observado em filhotes nascidos de cesarianas eletivas foi significativamente maior do que aqueles nascidos de cesarianas terapêuticas. Este estudo contribui para uma melhor compreensão dos efeitos de protocolos anestésicos aplicados às cesarianas, bem como das relações entre o tipo de parto, os níveis hormonais e a viabilidade neonatal na espécie canina.

Palavras-chaves: Cesariana eletiva. Citotoxicidade. Cortisol. Farmacologia perinatal. Micronúcleo.

CESAREAN SECTION AND ITS IMPLICATION ON NEONATAL VIABILITY: STUDY OF ANESTHETIC TOXICITY AND CORTISOL LEVELS IN THE CANINE SPECIES

ABSTRACT: The study aimed to evaluate the safety of two anesthetic protocols applied to cesarean sections, investigating the potential neonatal toxicity of each through the standardization and application of peripheral blood micronucleus assays. It also aimed to determine the maternal blood serum concentration of cortisol, establishing correlation with amniotic cortisol to assess fetal maturity and stress in canine offspring born from elective cesareans compared to those born from cesareans indicated for therapeutic resolution of dystocia. The work comprised two experiments. In the first, we adapted the micronucleus assay methodology to investigate the cellular effects of substances administered to dogs during the perinatal period. We utilized this technique to evaluate the toxicity of two anesthetic protocols administered to pregnant dogs. Fourteen bitches in the final third of gestation and their litters (62 puppies) were divided into three groups. The first group, consisting of 6 animals, was allocated for technique adaptation. The remaining 8 bitches were randomly divided into 2 groups: Lidocaine and Ropivacaine, receiving anesthetic induction with 3 mg kg⁻¹ of propofol and maintenance with isoflurane vaporization. In the Lidocaine group, epidural anesthesia was administered with 2% lidocaine at a dose of 2 mg kg⁻¹; in the Ropivacaine group, a dose of 1.5 mg kg⁻¹ of 1% ropivacaine was administered. Throughout the protocol adaptation phase, the animals consistently responded to the anesthetic procedure. No genotoxic or cytotoxic effects were observed in either group. In the second experiment, 30 bitches (22 undergoing elective cesareans and 8 undergoing therapeutic cesareans) and their litters (114 puppies) were evaluated. No correlation was observed between the type of delivery and cortisol or progesterone levels in maternal blood. However, distress observed in puppies born from elective cesareans was significantly higher than those born from therapeutic cesareans. This study contributes to a better understanding of the effects of anesthetic protocols applied to cesarean sections, as well as the relationships between delivery type, hormonal levels, and neonatal viability in the canine species.

Keywords: Cytotoxicity. Cortisol. Elective c-section. Micronucleus assay. Perinatal pharmacology.

CAPÍTULO 1- Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

A abordagem terapêutica durante a gestação, parto e lactação apresenta desafios únicos devido à dinâmica das variações fisiológicas e metabólicas observadas em cada uma das fases. As respostas fisiológicas singulares da fêmea e do conceito, bem como os processos de desenvolvimento em evolução nos neonatos, são de extrema importância na adaptação de protocolos clínicos nestes períodos. Essas alterações podem afetar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de medicamentos, impactando diretamente a eficácia e a segurança das terapias adotadas. Além disso, a transferência materno-fetal e a exposição via leite materno requerem atenção quanto às substâncias administradas a mãe que possam vir a atingir a corrente sanguínea dos fetos/neonatos (Breitzka et al., 1997)

O sucesso de qualquer terapia farmacológica empregada durante o período gestacional e perinatal exige, portanto, profunda compreensão das particularidades farmacocinéticas e farmacodinâmicas envolvidas no processo bem como das particularidades do estágio reprodutivo dos indivíduos tratados (Allegaert et al., 2014).

Apesar da relevância do tema, a literatura científica que se debruça sobre o assunto é bastante escassa, notadamente no que diz respeito a cadelas. A maioria das informações disponíveis acerca do tema derivam de estudos conduzidos em animais de laboratório e seres humanos, ou ainda, são extrapoladas de respostas obtidas em adultos não gestantes (Mathews, 2008).

Este trabalho aborda a complexidade da farmacologia perinatal em cadelas, enfocando limitações na definição de protocolos terapêuticos seguros. Explora-se a relevância da barreira placentária na transferência de medicamentos para o feto, considerando adaptações orgânicas durante a gestação e seu impacto no desenvolvimento embrionário em cada um dos estágios críticos do desenvolvimento fetal, com ênfase na teratogenicidade. Além disso, são discutidos aspectos de farmacoepidemiologia, envolvendo a avaliação de segurança por meio de ensaios clínicos e não clínicos, incluindo a

classificação dos fármacos de acordo com as diretrizes da FDA, oferecendo uma análise dos principais fármacos utilizados em cadelas gestantes e lactantes, destacando a importância da seleção cuidadosa desses medicamentos para evitar riscos à gestante e aos filhotes

2. OBJETIVOS

Objetivou-se com este estudo avaliar a segurança de dois protocolos anestésicos aplicados à cesarianas, investigando o potencial de toxicidade para os neonatos, de cada um deles, a partir da padronização e aplicação de ensaios de micronúcleo com sangue periférico. E determinar a concentração sérica de cortisol no sangue materno estabelecendo correlação com o cortisol amniótico para avaliação de maturidade e estresse fetal em filhotes caninos nascidos de cesarianas eletivas em comparação àqueles nascidos de cesarianas com indicação terapêutica para resolução de distocias

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Ciclo estral

As cadelas são consideradas monoéstricas não estacionais. O primeiro ciclo estral pode se manifestar entre os 6 e 10 meses de idade, podendo ser postergado até próximo dos 24 meses, dependendo da raça, porte e variações individuais (Kowalewski et al., 2018). Seu ciclo reprodutivo, dividido em quatro fases (proestro, estro, diestro e anestro), apresenta uma série de particularidades quando comparado a outras fêmeas domésticas (Silva, 2016).

Durante o anestro, que pode durar entre 80 e 240 dias, não há atividade ovariana. O proestro marca o início do ciclo estral e é caracterizado pelo aumento dos níveis séricos de estradiol (E2). Esta fase é clinicamente evidente por sinais como edema vulvar, secreção vaginal sanguinolenta e liberação de feromônios que atraem os machos, embora as fêmeas ainda não estejam receptivas ao acasalamento. Os níveis de E2 aumentam de 5 a 15 pg/mL no início do proestro para 40 a 120 pg/mL próximo ao seu final. O início da receptividade sexual sinaliza o início do estro, que dura até três dias após o pico de estradiol. Posteriormente, inicia-se o diestro, período no qual terá início

a gestação, em caso de cópula fértil. Esta fase tem duração de 50 a 80 dias, e nela a fêmea cessa a receptividade ao acasalamento. Os níveis de progesterona aumentam de 15 a 80 ng/mL antes de diminuir para <1 ng/mL no final do diestro (Concannon, 2011).

3.2. Gestação

O período gestacional nas cadelas pode ser dividida em 3 fases: primeiramente a fase do óvulo, que vai da fertilização à implantação; em seguida o período embrionário, no qual ocorre a organogênese e o rápido crescimento e desenvolvimento embrionário, e o processo de ossificação fetal; e por fim o período fetal, que se estende da ossificação até o parto e é caracterizado pelo crescimento e maturação dos órgãos, capacitando o feto para a vida extrauterina (Pretzer, 2008).

A gestação é um complexo processo fisiológico regido por uma série de alterações hormonais que permitem o desenvolvimento do feto no útero materno. É a fase mais sensível do ciclo reprodutivo dos animais, uma vez que seu sucesso está condicionado à perfeita coordenação entre o conjunto mãe-conceito(s) e suas interações tanto com o meio interno quanto externo (Hinderer et al. 2021). Para que ocorra a gestação é necessário cobertura ou inseminação artificial durante o período fértil. Os espermatozoides podem ficar armazenados em glândulas uterinas durante o estro, garantindo sua viabilidade e induzindo à capacitação espermática (Kawakami et al., 2000).

3.3. Placenta

A placenta é um órgão temporário presente durante a gestação dos mamíferos eutérios. Seu desenvolvimento se dá a partir da justaposição das membranas fetais: âmnio, cório, saco vitelínico e alantoide, e fusão com a mucosa uterina. É responsável pelas trocas gasosas, transporte de nutrientes, metabólitos e de outras substâncias, entre os organismos materno e fetal (Brólio et al., 2010).

A classificação placentária leva em conta o tipo e o número de membranas envolvidas e seu contato com o útero; o formato do órgão, o modelo de interdigitação, tipo e número de camadas de tecidos separando sangue materno e fetal e o arranjo geométrico dos capilares de trocas

maternos e fetais (Leiser; Kaufmann, 1994). Nos carnívoros, encontramos placenta endoteliocorial, zonária anular incompleta em gatos, uma vez que em mais de 60% dos casos é possível observar fissura placentária nesta espécie, e completa nos cães, de modo que as projeções endoteliais, se organizam na superfície coriônica em formato de uma cinta placentária (Ambrósio, 2004).

A estrutura vascular do cordão umbilical dos cães e dos gatos é composta por duas artérias umbilicais originadas da aorta abdominal e duas veias. Estes vasos se inserem ou emergem do tecido placentário realizando o contato materno-fetal e permitindo o transporte de substâncias e nutrientes (Ambrósio et al., 2002).

3.4. Mecanismos de transferência placentária

A barreira placentária endoteliocorial dos carnívoros é composta de 6 camadas, estando duas delas no endotélio materno, duas no trofoblasto sincicial e duas no endotélio fetal. A placenta apresenta permeabilidade seletiva e o intercâmbio placentário de substâncias é realizado através de três compartimentos: o sangue materno, o citoplasma do sinciciotrofoblasto, e sangue fetal, e ocorre por difusão passiva na membrana plasmática, por transporte ativo, ou ainda, com auxílio de proteínas e moléculas que agem como transportadores (Brólio et al., 2010).

A membrana plasmática é a estrutura primordial de transporte placentário. É constituída por uma bicamada lipídica e apresenta permeabilidade seletiva a diferentes moléculas. A espessura da membrana é inversamente proporcional à taxa de difusão simples observada. O mesmo não ocorre em relação à permeabilidade (Winterhager; Gellhaus, 2017).

A difusão simples e a difusão facilitada são mecanismos de transferência placentária passiva, ou seja, a favor do gradiente de concentração e sem gasto de energia. Na difusão simples, as moléculas atravessam sozinhas a membrana sinciciocapilar. Gases, moléculas hidrofóbicas, benzeno, ureia, etanol e pequenas moléculas sem carga elétrica são transportadas dessa forma. Já na difusão facilitada são utilizados canais proteicos e iônicos e proteínas de transporte para facilitar a transferência de açúcares, nucleosídeos e íons através da camada fosfolipídica (Pacifci; Nottoli, 1995).

Os mecanismos de transporte ativo são realizados contra o gradiente de

concentração e demandam gasto de ATP. Neles são utilizadas proteínas transportadoras conhecidas como bombas iônicas. As bombas de Classe P transportam íons, as de Classes V e F transportam prótons, e a Grande Família ABC é responsável pela transferência de aminoácidos e moléculas complexas (Pacifici; Nottoli, 1995).

Outro mecanismo de transporte placentário que necessita de gasto de energia para ser realizado é a endocitose. A transferência se dá a partir de uma invaginação da membrana plasmática e a formação de vesículas de transporte. Em seguida a macromolécula a ser transportada se liga a receptores específicos de membrana. É desta forma que as imunoglobulinas chegam à corrente sanguínea dos fetos (Audus, 1999). No entanto, a passagem transplacentária de imunoglobulinas em cães e gatos é insignificante.

A barreira transplacentária não oferece proteção completa ao feto contra substâncias circulantes no organismo materno. A passagem de fármacos pela barreira placentária é influenciada pela lipossolubilidade e concentração sistêmica das substâncias, bem como pelo gradiente de concentração materno-fetal. É válido salientar que as principais funções da placenta são o metabolismo de substâncias, a secreção de hormônios, e o transporte de nutrientes e gases (Leiser; Kaufmann, 1994). A transferência placentária de fármacos, ocorre quase que em sua totalidade de forma indesejada, como consequência do contato materno com determinada substância. A via transplacentária é raramente utilizada como via terapêutica, ficando, em geral, restrita a intervenções altamente especializadas na medicina humana pré-natal (Starodubtseva et al., 2023).

3.5. Circulação fetal

Desde o início da gestação até o parto o conceito depende completamente do organismo materno para sua nutrição, para realização da troca de gases e eliminação de metabólitos. Durante a fase embrionária, anteriormente à implantação e placentação, essas trocas são realizadas através dos líquidos uterinos, posteriormente a placenta passa a ser a interface de conexão entre os organismos materno e fetais (Robinson, 2004).

O sangue rico em oxigênio e nutrientes chega à placenta e entra na circulação fetal a partir da veia umbilical chegando inicialmente ao fígado. De

lá, é parcialmente desviado para a circulação hepática e o restante é conduzido através do ducto venoso, que liga a veia umbilical à veia cava posterior, e chega então ao átrio direito. Parte do sangue passa para o ventrículo direito e segue para os pulmões, que não são ricamente perfundidos uma vez que durante a fase fetal apresentam alta resistência vascular. Outra parte do sangue é desviada pelo ducto arterioso, que liga a artéria pulmonar à aorta inferior, e irriga a porção inferior do corpo do feto (Robinson, 2004).

A maior parte do sangue oxigenado atravessa o forame oval que liga os átrios direito e esquerdo. Chegando ao átrio esquerdo, passa para o ventrículo esquerdo e é bombeado saindo pela aorta ascendente para o cérebro. Mesmo com vários pontos em que o sangue oxigenado se mistura com o sangue pouco oxigenado, o sistema circulatório fetal é organizado de modo a permitir que o sangue melhor oxigenado chegue ao átrio esquerdo e possa irrigar o sistema nervoso central do feto (Robinson, 2004).

3.6. Alterações anátomo-fisiológicas decorrentes da gestação e sua influência no metabolismo de fármacos

A gestação implica em significativas alterações anatômicas e fisiológicas que tem como objetivo atender às demandas de cada uma das fases. Não somente a própria condição gestacional geral cause aumento das taxas metabólicas, mas é ainda necessário que hormônios, sangue, coração, pulmões, rins, sistema digestivo, se adaptem para fornecer condições que permitam desenvolvimento do feto e adequada preparação do organismo materno para o parto e o puerpério (Tan; Tan, 2013). Tais mudanças afetam a farmacocinética e interferem na distribuição, absorção, metabolismo e excreção de medicamentos durante a gravidez (Anderson, 2005)

As mudanças hormonais começam durante o ciclo estral e, a partir do momento da fecundação, provocam alterações adaptativas como resposta ao estímulo neuroendócrino gerado pela existência do conceito no trato reprodutivo da mãe. Nas mulheres, tais alterações são amplamente descritas e a literatura fornece informações robustas sobre o impacto da gestação em cada um dos sistemas (Pritchard; McDonald, 1980; Martins, 1982; Tulchinsky; Little, 1994), no entanto, nas espécies domésticas, em particular em cadelas e gatas, essas informações são escassas, sendo necessária a extrapolação a partir de

dados obtidos na espécie humana.

A manutenção da gestação é garantida por um delicado equilíbrio endócrino regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovariano (Concannon, 2000). Inicialmente, o desafio imunológico enfrentado pelo organismo materno consiste em equilibrar a imunossupressão necessária à tolerância do concepto no útero, enquanto mantém ativas suas defesas contra patógenos exógenos (Mor et al., 2011).

As alterações nos níveis circulantes de progesterona, prolactina, relaxina e estrógeno, em conjunto com as mudanças metabólicas inerentes ao período gestacional causam interferências em praticamente todos os sistemas orgânicos (Veiga et al., 2009), e modificam a farmacocinética de medicamentos que venham a ser administrados à fêmea (Bernardi, 2011).

Durante a gestação, as adaptações cardiovasculares são substanciais. O aumento do volume sanguíneo ocorre em decorrência da maior demanda exercida pelos fetos. Cerca de 25% do fluxo sanguíneo atende à irrigação uteroplacentária. Além disso a perfusão renal, da pele e das mamas também aumenta (Pascoe; Moon, 2001). O aumento da frequência cardíaca atinge seu pico no terço final da gestação (Blanco et al. 2012), sendo também observado o aumento do volume sistólico, com consequente incremento do débito cardíaco, o qual pode aumentar até 50% nesta fase. A pressão arterial média tende a permanecer estável devido ao equilíbrio entre o aumento do débito cardíaco e a diminuição da resistência vascular (Pascoe; Moon, 2001). O aumento do volume plasmático não é acompanhado proporcionalmente por aumento do número de eritrócitos, o que provoca diminuição da hemoconcentração, com valores de hematócrito, hemoglobina e proteínas totais proporcionalmente menores quando comparadas gestantes e não gestantes. Este quadro, denominado anemia gestacional, tem seu efeito diretamente relacionado ao número de fetos presentes no útero (Sifakis; Pharmakides, 2022).

O decúbito dorsal não é recomendado pelo fato do peso do útero gravídico exercer compressão na veia cava e consequente hipotensão, podendo causar sofrimento fetal, já que a manutenção do adequado fluxo sanguíneo fetal depende da pressão arterial materna. Nas cadelas, é pouco comum que se deitem naturalmente nesta posição durante a gestação, porém

deve-se tomar o cuidado no posicionamento em decúbito lateral para realização de intervenção cirúrgica, especialmente em cadelas de raças grandes e gigantes com grande número de filhotes. Apesar da recomendação, não foram documentadas diferenças na pressão arterial de gestantes submetidas a cesariana posicionadas em decúbito lateral ou dorsal (Probst; Webb, 1983).

No sistema respiratório, os vasos sanguíneos do nariz sofrem dilatação, favorecendo a ocorrência de congestão nasal, epistaxe e rinite. Adicionalmente, o desenvolvimento de edema das vias aéreas superiores, que afeta também a faringe e a laringe, pode representar um elemento de complexidade em situações que demandem intubação orotraqueal, especialmente em contextos obstétricos, como cesarianas (Hegewald; Crapo, 2011).

A expansão do útero e o aumento da pressão abdominal deslocam o diafragma cranialmente, a ação hormonal provoca relaxamento da musculatura intercostal e do esterno, aumentando o volume da caixa torácica, porém, reduzindo a capacidade de contração muscular; estes fatores causam dificuldade respiratória durante a gestação (Goldsmith, et al. 1995). A dispneia observada no final da gestação pode levar a hipóxia e, com isso, à acidose e depressão fetal. A diminuição do pH fetal, que naturalmente já é inferior ao materno, favorece a ionização de fármacos que venham a transpor a barreira placentária, podendo assim aumentar os efeitos tóxicos para os fetos (Farias, 2015). Durante o trabalho de parto ocorre aumento da hiperventilação, o que pode potencialmente influenciar o suprimento sanguíneo do útero e a oxigenação do feto. A indução anestésica é particularmente crítica devido ao risco de apneia, tornando a pré-oxigenação uma medida essencial para prevenir a hipóxia. No pós-parto, a função pulmonar retorna ao estado normal, mas o monitoramento é essencial, especialmente em pacientes submetidos a anestesia geral (Pascoe; Moon, 2001).

A gestação provoca efeitos no sistema nervoso com objetivo de manter a homeostase cerebral. Apesar da alta demanda metabólica e das mudanças que afetam o endotélio e a barreira hematoencefálica, diferentemente do que ocorre em outros órgãos, a circulação cerebral resiste às adaptações hemodinâmicas, e a autorregulação do fluxo sanguíneo protege o

microambiente cerebral. Ainda assim, as adaptações cerebrais à gravidez são relevantes na compreensão das complicações neurológicas associadas a quadros de pré-eclâmpsia que aumentam o risco de convulsões e hemorragias (Logue et al. 2016). Em relação à anestesia nota-se uma diminuição do tempo de indução anestésica e uma demanda até 40% menor no uso de anestésicos inalatórios. Devido ao ingurgitamento vascular na região, ocorre a diminuição do espaço epidural, desta forma, recomenda-se utilização de menor volume de anestésicos locais nas anestесias epidurais (Gaynor; Muir III, 2009).

A medida que a gestação avança acontecem alterações no sistema digestório decorrentes da ação da P4 sobre a musculatura lisa do trato gastrointestinal, e da compressão dos órgãos abdominais pelo útero gravídico que aumenta progressivamente de volume e desloca os intestinos e o estômago. Essas modificações anatômicas podem dificultar o diagnóstico de emergências cirúrgicas abdominais agudas e interferem no posicionamento do paciente e na localização das incisões cirúrgicas (Tan; Tan, 2013).

Os níveis elevados de P4 contribuem para a redução da motilidade gastrointestinal e o esvaziamento gástrico retardado, aumentando o tempo de trânsito, e podem levar a uma diminuição na absorção de fármacos administrados por via oral que, em geral, são absorvidos na mucosa intestinal. A acidificação do pH estomacal, em resposta ao aumento da produção de gastrina pela placenta afeta a absorção de medicamentos ácidos devido à maior ionização (Farias, 2015). A acidez estomacal, associada ao afrouxamento do esfíncter esofágico, a compressão abdominal, a hipomotilidade gastrointestinal, além da ação direta da P4, são fatores predisponentes para a ocorrência de náuseas, vômitos e constipação intestinal. Em mulheres grávidas, a esofagite de refluxo e sintomas de azia afetam mais de 50% das gestantes (Broussard; Richter, 1998). Assim, durante a indução anestésica e na recuperação, o risco de pneumonia aspirativa com aumento do dano pulmonar é digno de atenção, e requer uma técnica de indução rápida que proteja as vias aéreas, e a extubação deve só ser realizada quando os reflexos laríngeos estão presentes (Pascoe; Moon, 2001).

As modificações que acontecem na circulação hepática impactam na metabolização e eliminação de medicamentos. Observa-se um atraso nas reações catalisadas pelas enzimas do sistema do Citocromo P450, interferindo

na biotransformação de compostos ativos e na ativação de pró-drogas. Essas alterações resultam em redução das taxas de excreção, o que pode prolongar a meia-vida dos fármacos e aumentar o risco de concentrações plasmáticas tóxicas (Borlakoglu et al., 1993; Bernardi, 2011). O aumento dos níveis de proteína total observados durante a gestação pode ser considerado um reflexo indireto da influência do estrógeno e do cortisol, que estimulam o processo de anabolismo hepático. Em contraste é observada diminuição dos níveis de albumina sérica ao longo das semanas, uma vez que a preparação do organismo materno para o nascimento dos filhotes influencia a síntese proteica pelo fígado direcionando a produção para proteínas essenciais para o crescimento fetal final, parto e lactação (Vannucchi et al., 2016).

As adaptações renais são essenciais para o suporte adequado ao desenvolvimento fetal e para a manutenção da homeostase materna. Elas são mediadas pelas modificações do equilíbrio hormonal entre a progesterona e o estrogênio, que atuam aumentando a vasodilatação e a reabsorção de sódio nos túbulos renais. O débito cardíaco elevado e o aumento subsequente do fluxo sanguíneo renal, de 60 a 80%, causam incremento da taxa de filtração glomerular (TFG) em cerca de 50%. A hipoalbuminemia, em conjunto com a redução da afinidade de ligação às proteínas, observada ao longo da gestação, resultam em aumento do volume de distribuição de alguns fármacos e concentrações plasmáticas mais baixas (Vannucchi et al., 2026). O aumento do clearance renal está associado à diminuição das concentrações sanguíneas de fármacos que dependem de eliminação renal (Papich; Davis, 1986).

Existem diversos motivos que levam uma gestante em qualquer fase da gestação, inclusive no período periparto, a necessitar de intervenção clínica ou cirúrgica seja em função de alguma condição ginecológica ou obstétrica, seja por qualquer outro comprometimento de saúde que demande manejo farmacológico (Pascoe; Moon, 2001). É indispensável que se considere as alterações adaptativas decorrentes da condição gestacional e do puerpério para que os protocolos terapêuticos elaborados sejam seguros e efetivos.

3.7. Parto

O parto fisiológico compreende uma sequência de eventos neuroendócrinos e mecânicos, que ocorrem ao final da gestação, culminando

na expulsão de um ou múltiplos fetos, bem como de seus anexos, do útero materno (Voorwald; Tiosso 2015). Na espécie canina o parto, comumente, se dá entre 58 e 63 dias após a data da primeira cobertura e se desenvolve em 3 estágios.

O cortisol fetal desempenha um importante papel na sinalização de parto e é influenciado por vários fatores relacionados ao início do trabalho de parto e a processos fisiológicos como estresse materno e angústia fetal (Benfield et al. 2013). A resposta placentária ao aumento da produção de cortisol é a conversão de progesterona em estrogênio fazendo com que ocorra uma queda nos níveis de progesterona circulante que resultam em aumento da produção de prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$) e aceleração da maturação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal fetal (Veronesi et al. 2002). A ação das prostaglandinas estimula as contrações uterinas, o que provoca a liberação de ocitocina e consequentemente o aumento da força e frequência das contrações uterinas, dando início ao primeiro estágio do parto (período de dilatação), que dura de 6 a 12 horas podendo chegar a 36 horas em cadelas primíparas (Luz et al., 2005). Entre 12 e 24 horas antes deste estágio nota-se um declínio de 0,5 a 1°C na temperatura corporal da fêmea (Voorwald; Tiosso, 2015), este sinal tem utilidade clínica na previsão do início do trabalho de parto podendo ser utilizado pelo veterinário, em associação com outras variáveis, para determinar o melhor momento de intervenção no caso da opção por uma cesariana eletiva.

No segundo estágio (período de expulsão) é quando ocorre a expulsão através do canal do parto, formado pelo conjunto da cérvix totalmente dilatada, com a vagina e vestibulo. É seguida pelo terceiro estágio (período de expulsão dos anexos fetais) que geralmente ocorre alguns minutos após a expulsão de cada feto. É possível que o nascimento de múltiplos filhotes num curto período de tempo, preceda a expulsão conjunta de mais de uma placenta no terceiro período (Gendler et al., 2007). Entretanto, é mais frequente que os segundo e terceiro estágios aconteçam de forma intercalada até a expulsão dos anexos do último feto (Luz et al. 2005).

A adequada compreensão dos eventos que têm lugar durante o parto fisiológico é de suma importância na identificação etiológica e tomada de decisão em relação ao tratamento a ser estabelecido para possíveis patologias de parto (Gendler et al, 2007). As distocias são emergências comuns na prática

médica veterinária e são responsáveis pelo aumento do risco de morte materna e fetal (Cornelius et al. 2019). As causas de distocia podem estar relacionadas com problemas dos filhotes e/ou da fêmea gestante.

Devido ao caráter emergencial da maioria das cesarianas, muitas vezes é necessária a correção de disfunções orgânicas na fêmea gestante que venham a ser detectadas na avaliação pré-operatória, de modo a minimizar os riscos anestésicos e cirúrgicos (Farias, 2015). Isto demanda tempo e equipe qualificada, o que pode comprometer o sucesso da intervenção (Fossum, 2001). Por esta razão, muitos criadores e veterinários em atendimento pré-natal a fêmeas de raças pré-dispostas, com histórico de distocia anterior ou que apresentem patologias que favoreçam a ocorrência de distocias, optam pelo agendamento da cesariana, a ser realizada de forma eletiva. Moon et al. (2000) observaram um aumento de até 31% de filhotes nascidos vivos em cesarianas eletivas em comparação às emergenciais. Isto porque nas emergências, as fêmeas, comumente, chegam à atenção veterinária após um período prolongado de trabalho de parto, o que aumenta a ocorrência de sofrimento e morte fetal (O'Niel et al. 2019).

Para que seja possível a determinação do momento adequado para a realização da cesariana eletiva, é necessário que a cadela gestante passe por rigoroso acompanhamento veterinário pré-natal. Deve-se levar em conta uma série de fatores relativos à evolução normal do trabalho de parto. O tempo gestacional sofre influência do evento fisiológico a ser considerado. Quando levada em conta a data do pico pré-ovulatório de LH, a duração gira em torno de 65 ± 1 dia (Concannon, 1989). No entanto, se considerada a data da primeira cobertura, esta variação pode ser ainda maior. Isto porque o período de receptividade da fêmea é longo e se inicia antes da ovulação e, além disso, o tempo de sobrevivência dos espermatozoides no trato genital da fêmea chega a até 10 dias o que pode levar a um intervalo de 57 a 71 dias entre a fertilização e o parto (Tsuitsui, 1989). Apesar da ausência de consenso a respeito do assunto, alguns autores citam que gestações de ninhadas pequenas tendem a ter duração mais longa do que no caso de ninhadas grandes, e ainda que o tamanho da raça também influencie no tempo gestacional (Concannon, 2000; Eilts et al. 2005).

3.8. Particularidades de fetos, neonatos e adultos

As diferenças entre fetos, neonatos e animais adultos vão muito além do tamanho, peso e composição corporal. Cada uma das fases de desenvolvimento tem suas particularidades fisiológicas e metabólicas que devem ser levadas em conta frente à necessidade de uma abordagem clínica e farmacológica nesses períodos. A grande maioria dos fármacos utilizados durante a gestação, em neonatos e indivíduos jovens, não contam com estudos profundos de segurança nessas populações. Nesse cenário, a determinação das doses desses medicamentos é frequentemente uma extrapolação das doses prescritas para adultos, feita com base no critério de peso e tamanho corporal. No entanto, a dinâmica complexa do desenvolvimento e a maturação nas primeiras fases da vida torna essa abordagem potencialmente problemática, uma vez que pode conduzir a efeitos subterapêuticos ou desencadear eventos adversos (Rodieux et al., 2015).

Fêmea e conceito formam um conjunto único, cujas respostas metabólicas diferem das observadas em animais adultos não gestantes. Os protocolos terapêuticos nesta fase deve levar em conta as sutilezas fisiológicas destes animais. Nos fetos, as várias funções orgânicas estão imaturas, ou por vezes ainda não se desenvolveram, havendo interferência nos mecanismos de absorção, metabolização e eliminação dos fármacos. Durante a vida uterina pode ocorrer exposição a medicamentos através da placenta uma vez que praticamente todos os fármacos que a fêmea gestante recebe vão atravessar a barreira placentária e atingir a corrente sanguínea dos fetos, exceto aqueles ligados a proteínas (Brólio et al., 2010).

O nascimento é um evento crítico para o recém-nascido que precisa enfrentar uma série de modificações fisiológicas e metabólicas cruciais para sua adaptação à vida extrauterina. Filhotes com dificuldades adaptativas apresentam taxas de mortalidade significativamente mais altas (Konde et al., 2015). Neonatos são mais vulneráveis devido à imaturidade de seus sistemas, estando mais suscetíveis a hipotermia, hipoglicemia e desidratação uma vez que seus processos de termorregulação, gliconeogênese e homeostase não estão completamente desenvolvidos (Pereira et al., 2022).

A avaliação do escore de APGAR adaptado para neonatos caninos é uma ferramenta clínica muito útil na avaliação da vitalidade e predição da

viabilidade neonatal. São considerados fatores como frequência cardíaca, frequência e esforço respiratório, tônus muscular, irritabilidade reflexa, vocalização, reflexo de sucção e coloração da mucosa para atribuir pontuações que somadas compõe o escore. A aplicação do escore de APGAR auxilia profissionais veterinários na identificação precoce de possíveis complicações neonatais e na tomada de decisões clínicas adequadas para garantir o bem-estar e a sobrevivência dos filhotes (Veronesi, 2016).

Os neonatos experimentam mudanças significativas na farmacocinética e farmacodinâmica após o nascimento devido à dinâmica de maturação de seus órgãos e sistemas. É importante salientar que neonatos não são miniaturas de adultos e desta forma, suas particularidades devem ser investigadas a fim de que o manejo terapêutico seja estabelecido de forma adequada (Apparício, 2015). Ainda, é necessário que se observe o processo patológico que o conjunto está enfrentando, uma vez que estes interferem nas respostas orgânicas frente ao tratamento com determinado medicamento (Rebuelto; Loza, 2010; Ryu et al., 2018; Yue et al., 2023).

A transferência de substâncias pelo leite materno é um aspecto importante a ser considerado. O pH mais baixo do leite em comparação com o sangue materno, resulta na ionização e acúmulo de algumas substâncias no leite e impacta diretamente na exposição dos neonatos a esses compostos, que é de cerca de 2% da dose máxima recebida pela mãe (Breitzka et al., 1997; Koshimichi et al., 2011). Em casos de inflamação da glândula mamária, estima-se que alguns fármacos possam atingir nos filhotes lactentes um décimo da concentração plasmática atingida no animal adulto (Ferrari et al., 2022).

Nos neonatos, a biodisponibilidade das substâncias administradas por via oral é comprometida devido à elevação do pH gástrico em relação a filhotes mais maduros e animais adultos, bem como ao prolongado tempo de esvaziamento gástrico e à irregularidade do peristaltismo (Mata; Papich, 2011; Tayman, et al. 2011). A permeabilidade da mucosa intestinal, embora inicialmente alta nas primeiras horas de vida, tende a diminuir após a ingestão do colostro. Entretanto, é importante destacar que o intestino neonatal exibe uma significativa proliferação de vilosidades, o que, por sua vez, favorece a absorção de fármacos por essa via. A colonização incipiente da microbiota

intestinal nos neonatos pode potencialmente influenciar a eficácia de medicamentos que dependem da ativação intestinal (Oliveira et al., 2020).

As peculiaridades metabólicas e de distribuição em neonatos também merecem atenção. As vias de metabolismo e excreção ainda estão em desenvolvimento nos neonatos, resultando em diferenças na taxa de absorção, metabolização e eliminação de fármacos em comparação com animais adultos. Além disso, a imaturidade de sistemas como o hepático e renal pode impactar a segurança e eficácia dos medicamentos administrados (Papich; Davis, 1986; Mathews, 2008).

O sistema do citocromo P450 se desenvolve precocemente durante a fase fetal (Bernardi, 2011), no entanto a função hepática reduzida nos neonatos está associada a sua imaturidade, o que pode resultar no aumento do potencial tóxico de fármacos que necessitam de processos de glicuronização para a metabolização. Além disso, a gliconeogênese, a glicogenólise, a síntese proteica e o metabolismo de ácidos biliares hepáticos apresentam um estágio incipiente nos neonatos, o que ocasiona modificações nos processos de metabolismo e distribuição de drogas ligadas a proteínas circulantes (Short; Davis, 1970). A função renal incompleta resulta em alterações na absorção, distribuição, metabolismo e em uma taxa de depuração reduzida o que tende a prolongar a meia vida de certos fármacos levando a concentrações plasmáticas mais elevadas no estado de equilíbrio (Bernardi, 2011; Rodieux et al., 2015).

As diferenças na relação entre a proporção crânio-corpo em neonatos em comparação com adultos têm implicações significativas na distribuição de agentes farmacológicos (Mata; Papich, 2011, Saunders et al., 2012). A barreira hematoencefálica protege o cérebro de substâncias indesejadas e mantém um ambiente cerebral estável para um funcionamento neuronal adequado. Porém, durante o desenvolvimento fetal e neonatal, em que se encontra em processo de maturação, ela é mais permeável em comparação com adultos. A alta permeabilidade que protege o neonato contra deficiências nutricionais, também torna seu sistema nervoso central mais vulnerável a fármacos e toxinas circulantes, além de condições patológicas aos fármacos circulantes (Saunders et al., 2012; Vieira e Sousa, 2013).

A evolução da relação do volume de líquido intracelular e extracelular ao longo do desenvolvimento neonatal é uma observação importante nesse

contexto. Inicialmente, neonatos exibem uma quantidade de líquido extracelular superior à intracelular, mas à medida que o desenvolvimento prossegue, esse padrão se inverte (Ferreira; Sousa, 2004, Verma; London, 2015), e este rearranjo tem implicações farmacocinéticas diretas. A concentração plasmática máxima de compostos hidrossolúveis é reduzida em neonatos e filhotes em virtude do volume de distribuição proporcionalmente elevado. Em contraste, substâncias lipossolúveis frequentemente apresentam concentrações plasmáticas superiores, visto que não ocorre sequestro para o tecido adiposo, em razão da baixa porcentagem de gordura corporal nos estágios iniciais de desenvolvimento (Bernardi, 2011; Mata; Papich, 2011).

4. Farmacologia e terapêutica perinatal

Na medicina humana é comum que gestantes necessitem tratamento para condições agudas, como dor, náuseas e vômitos, infecções do trato respiratório e do trato urinário, além de condições crônicas, como transtornos psiquiátricos, hipertensão, infecção pelo HIV, epilepsia, transplante de órgãos, condições reumatológicas ou transtorno de abuso de substâncias (Sevene et al., 2012; Aragão; Tobias, 2019; Al-Ani, 2020). Além disso, a terapia medicamentosa também se faz necessária para abordar condições induzidas pela gravidez, como distúrbios hipertensivos, trabalho de parto prematuro e diabetes gestacional (Rubin et al. 1993; Lailier et al., 2023). Nestes casos, a atenção médica é voltada para a saúde de dois (ou mais) pacientes, a mãe e o(s) feto(s), e o estabelecimento de um protocolo terapêutico seguro que deve considerar a transferência placentária dos fármacos empregados.

Na medicina veterinária é menos comum que fêmeas em tratamento crônico sejam colocadas em reprodução, ainda assim, uma gestante apresentando algum problema de saúde que requeira atenção farmacológica seja para manejo clínico ou cirúrgico de alguma intercorrência que venha a sofrer no período (Pascoe; Moon, 2001), deve ser avaliada quanto ao risco versus benefício do tratamento, considerando o potencial tóxico dos fármacos a serem utilizados frente ao comprometimento gestacional decorrente da patologia em questão. As alterações decorrentes da gestação devem ser consideradas com o propósito de estabelecer manejo farmacológico adequado

às demandas da gestante, uma vez que são capazes de mudar o comportamento farmacocinético de medicamentos utilizados no período (Matar et al., 1999; Ryu, et al. 2018).

O estudo farmacológico perinatal é um tema bastante negligenciado pela indústria farmacêutica. O desenvolvimento de fármacos que atendam às necessidades de gestantes e recém-nascidos não é prioridade nem mesmo na medicina humana (Martinez; Modric 2010), e um sinal claro disso é o fato de quase 90% dos fármacos utilizados em neonatos e crianças pequenas serem *off-label*, ou não registrados. Isso ocorre, pois a condução de ensaios clínicos nestes grupos esbarra em entraves éticos e logísticos (Adam et al., 2011; Barret; Azer, 2023).

Até a década de 1970, gestantes, neonatos e crianças pequenas eram deliberadamente excluídos de ensaios clínicos sob a justificativa de que tais ensaios seriam antiéticos (Andrade et al., 2011). Somente a partir de uma carta redigida pela Academia Americana de Pediatria, em 1977, é que se determinou que a exclusão destas populações as colocava em maior risco do que os testes em si, e desta forma foi dado o primeiro passo para o desenvolvimento de estudos farmacológicos perinatais (Jain, 2019). Além da ampla gama de processos fisiopatológicos que os neonatos podem vir a sofrer, existe também a dificuldade em acessar as respostas e acompanhar os efeitos a longo prazo dos tratamentos em organismos em crescimento (Barret; Azer, 2023). Una a isso a complexidade da farmacotécnica voltada para recém-nascidos (dose, tamanho, apresentação) e é possível entender por que esta área da farmacologia ainda tem tanto a crescer.

A farmacologia perinatal apresenta nuances complexas em relação às variações na absorção, distribuição e metabolismo de fármacos, em gestantes, fetos e neonatos em relação a animais adultos não gestantes. Essas diferenças têm implicações cruciais na eficácia e segurança das terapias farmacológicas administradas em diferentes estágios de desenvolvimento (Allegaert et al., 2014). Esta modalidade terapêutica deve cumprir exigências de segurança que contemplem tanto a gestante quanto os filhotes e, para tal, é necessário compreensão dos processos fisiológicos envolvidos no desenvolvimento de cada espécie, bem como dos mecanismos farmacocinéticos de cada fármaco empregado (Short; Davis, 1970; Short; Stith, 1973; Bell; Ecobichon, 1975). De

posse dessas informações, o médico veterinário seria então capaz de elaborar um protocolo terapêutico adequado ao conjunto a ser tratado. Esta fórmula aparentemente simples é severamente dificultada pelo fato de que tais informações raramente estão disponíveis e, por isso, a determinação do risco-benefício de vários tratamentos se apoia na extrapolação a partir de outras espécies ou animais adultos não gestantes. Ainda, parte dos dados utilizados na veterinária derivam de conhecimentos obtidos na espécie humana, os quais por sua vez, são determinados com base em informações de mulheres não gestantes (Mathews, 2008).

4.1. Toxicologia do Desenvolvimento

A toxicologia do desenvolvimento é um campo da biologia que investiga as alterações causadas por agentes externos que podem interferir no desenvolvimento desde antes da concepção, ao longo do período pré-natal, após o nascimento e por toda fase de crescimento do indivíduo (Camargo et al., 2018). A gravidade das lesões e o grau de morbidade resultante dessas alterações dependem da fase da gestação e do período crítico de desenvolvimento de cada sistema (Bernardi, 2011). Esses períodos são mais detalhadamente descritos em estudos realizados em animais de laboratório e em seres humanos (Liu, 2007; Hammerman, 2007; Nakmura; Fukami, 2009).

O uso de medicamentos no período gestacional e perinatal afeta diretamente a saúde da mãe e indiretamente a da prole. O entendimento das etapas envolvidas no estabelecimento, manutenção da gestação e desenvolvimento embrionário é um pilar fundamental para garantir a segurança e o bem-estar desses indivíduos, e discernir os potenciais impactos de um protocolo farmacológico proposto. Por meio dessa compreensão, é possível identificar momentos críticos nos quais a exposição a medicamentos pode acarretar efeitos adversos no processo de desenvolvimento fetal, assim como no subsequente crescimento e desenvolvimento pós-natal (Matsui, 2012).

Diferente da maioria das espécies cujo período fetal é mais longo que o embrionário, nos cães, a fase embrionária se estende por mais da metade da gestação (Oliveira et al. 2015). Ainda no período do ovo, durante a fase de implantação qualquer alteração ou exposição a substâncias que a fêmea sofra pode perturbar o processo, levando a falha ou desenvolvimento anormal da

placenta. Isso pode acarretar em comprometimento no fornecimento de nutrientes e oxigênio ao embrião em desenvolvimento, e levar a um retardo do crescimento e anormalidades no desenvolvimento. Quadros mais graves podem resultar em morte embrionária e perda gestacional (Bernardi, 2011).

O período embrionário é uma fase caracterizada por rápida divisão celular e diferenciação, levando à formação de órgãos e estruturas importantes. As injúrias causadas pela exposição a substâncias teratogênicas durante essa fase podem interferir nos processos celulares normais, causando anormalidades, malformações, e comprometimentos funcionais em diversos sistemas de órgãos (DeFreitas et al., 2022).

A fase de organogênese é marcada pelo desenvolvimento e diferenciação de órgãos e sistemas específicos (Vuillemin; Pexieder, 1989; Pieri et al., 2015). Durante esse período, o feto em desenvolvimento é altamente suscetível aos efeitos tóxicos de substâncias, sendo o período mais sensível em relação à morbidade pós-natal. O resultado das injúrias pode variar de acordo com o grau de dano causado nos fetos dependendo do período da gestação em que ocorre a exposição. Os períodos críticos se referem a fases de intenso desenvolvimento de um órgão ou sistema, assim, uma injúria nesta fase comprometerá a integridade de um grande número de células, e a gravidade do dano depende do momento e da duração da exposição, bem como da vulnerabilidade específica de cada sistema de órgãos (Gerenutti et al., 1991; Camargo et al., 2018).

No período de desenvolvimento fetal, no terço final da gestação, o foco se volta para o crescimento e a maturação dos órgãos e sistemas já formados. Embora o desenvolvimento estrutural principal esteja completo, e os fetos sejam mais resistentes aos efeitos letais, a exposição a agentes potencialmente teratogênicos ou tóxicos nesta fase, pode resultar em restrição de crescimento, baixo peso ao nascer, anormalidades neurocomportamentais e consequências de saúde a longo prazo (Gerenutti et al. 2008; Kuiper-Makris et al., 2018). Além disso, a alta replicação celular neste período favorece a ocorrência de desordens funcionais e carcinogênese (Bernardi, 2011; Camargo et al., 2028).

A exposição a medicamentos durante a gravidez pode levar a várias alterações no feto, sendo elas de natureza funcional ou estrutural. As

alterações funcionais ou bioquímicas referem-se a mudanças nos processos fisiológicos, enquanto as alterações estruturais ou morfológicas envolvem mudanças físicas no feto em desenvolvimento (Hikkaduwa Koralage; Perera, 2023). Essas alterações podem resultar em lesões reversíveis, quando não causam danos permanentes, ou lesões irreversíveis, que são caracterizadas por danos permanentes, que podem ou não ser compatíveis com a vida. As lesões irreversíveis podem ser ainda classificadas como embrioletais, teratogênicas ou embrio/fetotóxicas, dependendo do grau de lesão, do momento da exposição e dos efeitos resultantes no organismo (Bernardi, 2011; Kuiper-Makris et al., 2018).

4.2. Exigências de Segurança

A compreensão dos seres vivos em relação aos elementos tóxicos e não tóxicos ao organismo, é de grande importância como necessidade de segurança básica para a sobrevivência. Ao longo das eras, as espécies desenvolveram mecanismos para distinguir substâncias que poderiam ser utilizadas como alimento das que representavam ameaças potenciais. Inicialmente, essa capacidade evoluiu como um meio de determinar fontes de nutrição viáveis. Com o tempo, essa compreensão expandiu-se para incluir a utilização estratégica de venenos de animais e plantas, visando auxiliar na caça, pesca e, posteriormente, nas atividades bélicas (Fukushima; Azevedo, 2008).

A história da medicina é marcada por momentos que ressaltam a necessidade crítica de avaliar a segurança e a toxicidade de medicamentos, especialmente durante a gestação. Um dos episódios mais notórios é o incidente da talidomida na década de 1960 (Kim; Scialli, 2011). A talidomida foi inicialmente comercializada como sedativo e antiemético para mulheres grávidas, porém após seu lançamento no mercado, ficou evidente que seu uso estava associado a deformidades congênitas graves em recém-nascidos, especialmente focomelia, em que os membros das crianças não se desenvolviam adequadamente; e também defeitos nos ouvidos, olhos e em órgãos internos, provocando uma epidemia global de malformações (Fraga et al. 2016; Malik; Cohen, 2021).

A exigência para registro de medicamentos, até aquele momento,

consistia na realização de estudo de segurança utilizando apenas uma espécie animal. No caso do processo de liberação de talidomida, foi utilizado o rato, espécie pouco sensível a ação teratogênica do medicamento, ao passo que os camundongos são mais sensíveis e apresentam resultados mais próximos aos observados em seres humanos (Bernardi, 2011). Este revelou a vulnerabilidade dos fetos aos agentes teratogênicos e ressaltou a importância de testes mais rigorosos em modelos animais para avaliação dos efeitos potenciais dos medicamentos. O impacto nas práticas regulatórias e de pesquisa médica fez com que a partir desse incidente, as agências reguladoras de saúde em todo o mundo revisassem e fortalecessem os requisitos para testes de segurança e toxicidade de medicamentos, especialmente aqueles destinados a utilização em gestantes (Jesus et al. 2020).

Na década de 1970, a Food and Drug Administration (FDA), órgão regulatório dos Estados Unidos, passou a estabelecer padrões de qualidade para a fabricação de medicamentos e a exigir registros anuais para fabricantes. Aprovação prévia da FDA tornou-se obrigatória para a comercialização de novos medicamentos. A legislação também definiu critérios para a retirada do mercado de medicamentos já aprovados e introduziu regulamentações mais rigorosas para medicamentos experimentais. Além disso, a FDA reassumiu o controle da publicidade de medicamentos prescritos (Martinez et al. 2002).

No contexto da medicina veterinária, as lições da talidomida sobre a necessidade de avaliar a segurança e a toxicidade dos medicamentos utilizados durante a gestação são igualmente relevantes. No entanto, enfrentamos desafios únicos devido à diversidade fisiológica e metabólica entre as espécies, e a carência de informações em espécie alvo, o que é uma lacuna preocupante, uma vez que expõe gestantes a riscos desconhecidos para si e para o desenvolvimento saudável das crias. Existem diversos modelos de testes de segurança farmacológica *in vivo* utilizados na investigação dos efeitos tóxicos dos medicamentos. Esses sistemas abrangem uma variedade de organismos, desde invertebrados, como insetos e vermes, a peixes, aves e várias espécies de mamíferos de laboratório (Camargo et al., 2018). Deste modo, boa parte das informações de segurança de medicamentos destinados a animais gestantes são adaptadas daquelas oriundas de estudos em humanos ou em animais de laboratório (Cavalli et al., 2006; Sharma et al., 2019), e é

essencial que os medicamentos utilizados em animais gestantes sejam submetidos a testes de segurança e toxicidade específicos.

A elaboração de diretrizes e guias de referência para avaliar os riscos perinatais associados a medicamentos é um recurso capaz de fornecer informações valiosas para os profissionais de saúde auxiliando na tomada de decisões sobre protocolos terapêuticos durante a gravidez (Chaphekar et al., 2021). Um ponto crucial na investigação de segurança farmacológica é o estabelecimento de metodologias de acesso às respostas das gestantes, fetos e neonatos frente à exposição a determinada substância (Almeida; Riordan, 2007).

A toxicidade do desenvolvimento é um termo abrangente empregado para descrever qualquer impacto adverso que possa manifestar-se na descendência. Os estudos de toxicidade do desenvolvimento e reprodutiva em animais, comumente referidos como estudos DART (do inglês, Developmental and Reproductive Toxicity), são meticulosamente delineados para a avaliação da segurança de substâncias específicas em todas as fases do ciclo de vida. Estes estudos abarcam desde a análise de adultos reprodutores antes da concepção, passando pela fase embrionária e fetal, até o completo desenvolvimento reprodutivo das gerações subsequentes. O escopo da avaliação abrange a ocorrência de morte (de embriões, fetos ou neonatos), a identificação de alterações no processo de crescimento e desenvolvimento físico, e a ocorrência de comprometimentos estruturais e/ou funcionais (Laffan; Tassinari, 2017).

A avaliação do uso de medicamentos na gestação é essencial para entender os riscos potenciais e os efeitos no feto em desenvolvimento. Vários métodos como registros médicos e análise de amostras biológicas, têm sido utilizados para coletar dados que respaldem as pesquisas e direcionem a condução de estudos de segurança nessa fase. Há de se considerar que qualquer tratamento proposto na gestante tem potencial para atingir a corrente sanguínea do(s) feto(s), e que os organismos em desenvolvimento não apresentam a mesma capacidade de metabolização, biotransformação, e eliminação, o que leva à alterações farmacocinéticas que fazem com que um fármaco seguro para animais adultos não gestantes, possa apresentar características farmacotóxicas em indivíduos imaturos (Wise, 2013).

É importante destacar as diferenças técnicas entre estudos de segurança farmacológica e estudos de toxicologia regulatória. Estudos de segurança farmacológica são conduzidos com objetivo de caracterizar a relação farmacodinâmica e farmacocinética dos efeitos adversos de um medicamento (Pugsley et al., 2008). Em geral é utilizada uma única dose com dosagens escalonadas e avaliações seriadas; podem ser utilizadas diversas espécies animais, bem como a condução em espécie alvo e o número de animais utilizados neste tipo de teste é menor do que o necessário nos estudos de toxicidade. Os estudos de toxicidade com fins regulatórios além de demandarem mais animais, envolvem regimes de dose mais intensivos, com dosificações diárias que podem se estender por longos períodos. Os estudos de segurança servem de complementação a estudos de toxicidade de medicamentos que já contam com liberação da agência responsável (Luft e Bode, 2002).

As agências de regulamentação como a FDA, nos Estados Unidos, a European Medicines Agency (EMA), na Europa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil, o International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH), que inclui os Estados Unidos, a União Europeia e o Japão, orientam e fiscalizam estudos de segurança farmacológica (Makris et al. 2011) que podem envolver um série de avaliações como variáveis sanguíneas, de bioquímica sérica, bem como alterações clínicas decorrentes da utilização de determinado fármaco (Araújo et al, 2023) e são facilmente adaptáveis ao estudo em animais gestantes.

Ensaio de micronúcleos *in vivo* utilizando roedores, são recomendados por agências de regulamentação em testes de segurança com objetivo de acessar o potencial genotóxico e citotóxico de produtos farmacêuticos. O procedimento envolve a administração de uma única dose do produto testado em camundongos, seguida pela colheita de medula óssea ou sangue periférico após 24 a 48 horas para preparação de lâminas histológicas. É realizada a contagem de eritrócitos policromáticos (PCE), jovens, e sua avaliação em relação ao número de eritrócitos normocorados (NCE), maduros. O índice de citotoxicidade é dado pela relação entre PCE e NCE quando comparados animais tratados com o controle (Krishna; Hayashi, 2000).

Embora alguns métodos *ex vivo* e *in vitro* para estudar a transferência transplacentária tenham se mostrado úteis, como o modelo de perfusão placentária e o uso de linhagens celulares específicas (Sastry, 1999), eles ainda apresentam limitações, uma vez que a confiança na previsão da farmacocinética fetal é abalada pela ausência ou dificuldade de obtenção de muitos parâmetros que afetam a transferência de medicamentos pela placenta. A determinação da taxa de transferência placentária, a partir da quantificação da concentração plasmática de uma substância no sangue materno, em comparação à concentração plasmática no sangue de cordão ou no sangue dos fetos, no momento do parto, e um meio de acessar o potencial de distribuição para os fetos de fármacos utilizados na mãe (Cavalli et al., 2006). Além destas, existe a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) que é uma técnica de análise que permite a separação e quantificação de substâncias presentes em matrizes biológicas mesmo quando em concentrações extremamente baixas (Lanças, 2009).

Recentemente, modelos de Farmacocinética Baseada em Fisiologia, ou PBPK na sigla em inglês de Physiologically-Based Pharmacokinetic tem avançado significativamente na previsão da exposição a medicamentos em gestantes e fetos. Ao incorporar parâmetros fisiológicos, a dados pré-clínicos e clínicos, o PBPK é usado para prever e otimizar a dosagem de medicamentos utilizados em gestantes auxiliando na avaliação de riscos de segurança e eficácia. Pode também ser empregada para orientar a utilização de medicamentos na amamentação com base na transferência pelo leite (Chaphekar et al., 2021).

4.3. Potencial Tóxico dos Medicamentos na Gestação e Lactação

Diferentes vias de administração podem levar a variações na absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do medicamento, o que pode afetar seu perfil de toxicidade. Porém, estudos específicos que se concentram no impacto da via de administração no potencial tóxico de medicamentos em cadelas gestantes são bastante limitados (Frederiksen, 2001).

A idade gestacional da cadela também pode afetar o potencial tóxico de alguns fármacos. Ao longo das diferentes fases da gestação, as necessidades metabólicas e fisiológicas da gestante e dos fetos em desenvolvimento variam,

e com isso a capacidade do organismo da mãe para metabolizar e eliminar medicamentos. Ainda, algumas fases da gestação são mais sensíveis aos efeitos adversos dos medicamentos do que outras devido aos períodos de desenvolvimento críticos de cada sistema (Bernardi, 2011).

O potencial tóxico de medicamentos em cadelas gestantes e lactantes, assim como em mulheres, pode variar substancialmente na dependência de vários fatores, incluindo o medicamento em si, a dose utilizada, o esquema posológico, a via de administração e a idade gestacional. Alguns medicamentos são considerados relativamente seguros durante a gestação, enquanto outros podem representar um risco significativo para a mãe e seus filhotes em desenvolvimento. A classificação ABCDX do FDA utilizada para indicar a segurança de medicamentos utilizados na gestação, foi substituída em 2015 pelas novas diretrizes do PLLR - Pregnancy and Lactation Labeling Rule- (Brucker; King, 2017).

Pela antiga classificação, criticada por sua simplicidade, a determinação de risco era feita com base no potencial teratogênico dos medicamentos, sem no entanto, considerar os diferentes estágios de desenvolvimento fetal. Já a abordagem PLLR leva em conta múltiplos fatores, como a dose do medicamento, o momento da exposição e a suscetibilidade da espécie, proporcionando uma avaliação mais precisa e individualizada dos riscos. De acordo com a nova classificação os medicamentos são divididos em três categorias principais: 1) gravidez (que inclui também trabalho de parto e nascimento); 2) lactação; e 3) mulheres e homens em idade fértil (FDA, 2014).

A sessão “gravidez” deve conter o registro da liberação do medicamento para uso nesta fase, bem como o contato para obtenção de informações e acesso a estudos que suportem a indicação do medicamento e resumam os riscos da utilização. Já na sessão “lactação”, o novo regulamento determina que esteja especificado se o medicamento é ou não absorvido sistemicamente, e caso seja, incluirá informações sobre presença no leite materno, efeitos no lactente e na produção de leite, informações sobre minimização da exposição ao medicamento e estratégias para redução de reações adversas no lactente, a menos que a amamentação seja desaconselhada durante o tratamento. A sessão “mulheres e homens em idade fértil” deve apresentar dados relevantes sempre que testes de gravidez ou contracepção forem necessários ou

recomendados antes, durante ou após o tratamento com o medicamento, ou quando houver informações que sugiram efeitos do medicamento na fertilidade com base em dados humanos ou animais (F.D.A., 2014).

O FDA considerou que a classificação ABCDX era inconsistente quanto à comunicação de risco, uma vez que não transmitiam com precisão os diferentes níveis de comprometimento fetal/neonatal em cada uma das fases. As novas diretrizes do PLLR apresentam de forma mais efetiva os riscos potenciais da exposição ao medicamento com base em dados humanos ou animais, e a partir daí, o regulamento final determinou a remoção das categorias A, B, C, D e X de todos os rótulos de produtos farmacêuticos (Brucker; King, 2017).

Essas mudanças visam melhorar a compreensão dos riscos e benefícios de fármacos, facilitando decisões informadas de prescrição e aconselhamento aos pacientes. Vale salientar que a dose e a posologia do tratamento também podem influenciar seu potencial tóxico e, portanto, é fundamental que os veterinários façam ajustes de acordo com as necessidades específicas da cadela gestante em cada etapa, uma vez que um esquema posológico desalinhado pode aumentar o risco de efeitos adversos (Anderson, 2005). Os dados de segurança farmacológica utilizados em sua maioria derivam de estudos epidemiológicos em humanos e animais de laboratório e, embora haja limitações na extrapolação desses dados para espécies caninas, eles direcionam a identificação de fármacos contraindicadas na maioria das espécies (Wiebe; Howard, 2009).

4.4. Fármacos mais utilizados na gestação em cadelas

É de extrema importância destacar que fêmeas em tratamento crônico não devem ser intencionalmente colocadas em reprodução devido aos potenciais efeitos adversos dos medicamentos sobre o desenvolvimento fetal. No entanto, é igualmente relevante reconhecer que existem circunstâncias em que podem ocorrer incidentes que levem a uma gestação indesejada (Dejneka et al., 2020), ou ainda, uma cadela gestante pode enfrentar condições de saúde que exigem intervenção médica (Willemse et al., 2019; Aguilera-Padros et al. 2023, Basuki et al., 2019).

Os dados de segurança das vacinas durante a gestação e lactação em

cadelas são limitados. Sendo assim, o ideal é que o protocolo de imunização seja realizado algumas semanas antes do acasalamento, para que haja tempo suficiente para produção de anticorpos pela fêmea que serão transmitidos aos neonatos via colostro nas 24h pós-parto (Wiebe; Howard, 2009).

A administração de suplementos de ácido fólico e ferro em cadelas gestantes desempenha um papel fundamental na promoção da saúde da mãe e no desenvolvimento adequado dos filhotes. O ácido fólico é essencial para a divisão celular e para o crescimento dos tecidos durante a gestação. O ferro é necessário para a formação de glóbulos vermelhos e o transporte adequado de oxigênio para a mãe e os filhotes em desenvolvimento. A deficiência de ferro pode levar à anemia, que pode ser especialmente prejudicial durante a gravidez (Ivanova; Georgiev, 2018). Vale destacar que a suplementação monitorada de ácido fólico não apenas contribui para a saúde geral, mas também previne a ocorrência de lábio leporino e fenda palatina em cães (Domoslawska et al., 2013).

O controle de ecto e endoparasitas é de extrema importância para garantir a saúde de cadelas gestantes e seus filhotes. O parasitismo compromete a absorção e disponibilidade de nutrientes podendo levar a anemia, desnutrição e perda gestacional. Além do risco de transmissão transplacentária e transmamária de *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* (Payne et al. 2000). É recomendada a desparasitação imediatamente antes do período de reprodução, seguida de um intervalo de pelo menos 4 semanas, para evitar comprometimento dos estágios iniciais da gravidez. Os protocolos profiláticos antes do parto devem ser iniciados após 43 dias de gestação, utilizando medicamentos seguros para gestantes como: Fenbendazol, Ivermectina, Pirantel, Praziquantel, Selamectina, Milbemicinoxum (Ivanova; Georgiev, 2018).

Os benzimidazóis como o albendazol e fenbendazol, as isoquinolonas, pirimidinas e o fipronil apresentam alta margem de segurança podendo ser utilizados em fêmeas gestantes. As avermectinas e piretroides devem ser utilizados com cautela tanto em fêmeas gestantes quanto em animais jovens,. No caso das avermectinas, especialmente, deve-se evitar seu uso em Pastores alemães, de Shetland, Sheepdogs , Collies e Whippets, pois apresentam predisposição à toxicidade (Spinosa, 2023).

Algumas condições de saúde podem requerer a utilização de antibióticos durante a gestação (Bridwell et al., 2019; Ahmed, et al., 2023; Amanollahi et al. 2023.) e a segurança deste tipo de tratamento ainda é um tema de debate no qual existem muitas lacunas de informação a serem preenchidas. Os antimicrobianos são a classe de medicamentos mais comumente utilizadas na gestação e a maioria deles é considerada de baixo risco nesta fase. Amoxicilina, ampicilina, amoxicilina com clavulanato, cefalexina, clindamicina, eritromicina e azitromicina são alguns dos antibióticos considerados seguros para fêmeas gestantes. (Wiebe e Howard, 2009).

Alguns autores recomendam restrições específicas para certos medicamentos, por exemplo, o uso de tetraciclina e doxiciclina é contraindicado durante a gravidez, devido ao risco de efeitos adversos nos filhotes como defeitos esqueléticos e comprometimento na formação do esmalte dentário; o miconazol e o cetoconazol causam alterações embriotóxicas e malformações. O metronidazol deve ser evitado no início da gestação podendo ser utilizado, com segurança, próximo ao termo. As fluoroquinolonas como ciprofloxacino e enrofloxacino prejudicam o desenvolvimento da cartilagem provocando artropatias por erosão; o uso da getamicina está relacionado ao aparecimento de efeitos oto e nefrotóxicos, e as sulfas e supressão medular e distúrbios autoimunes (Wiebe; Howard, 2009; Bernardi; Spinosa, 2023).

Cadelas gestantes ou em lactação eventualmente precisarão de tratamento analgésico por uma série de razões que podem ou não estar relacionadas diretamente à gravidez ou ao parto (Pyke; Shut, 2003), como cirurgias emergenciais, traumas e afecções inflamatórias, ou ainda para manejo da dor pós-operatória em cadelas submetidas a cesariana. Além disso, condições dolorosas como mastites e metrites podem demandar resgate analgésico (Ferrari et al., 2022), uma vez que a dor compromete o bem-estar da fêmea o que reflete diretamente na produção de leite e na capacidade de nutrir e cuidar dos filhotes, interferindo significativamente nas taxas de sobrevivência das ninhadas (Pereira et al., 2022). De acordo com o World Small Animal Veterinary Association (WSAVA, 2020), os opioides podem ser utilizados em protocolos pré-anestésicos e, em geral, os filhotes se apresentam vigorosos após o parto, porém é necessário cautela na utilização uma vez que

são muito solúveis em lipídios e podem atingir concentrações plasmáticas altas nos filhotes. Apesar de haver uma série de protocolos estabelecidos para manejo de dor nessas situações, ainda pouco se sabe sobre a segurança específica em cadelas gestantes e seus filhotes, uma vez que a maioria dos dados utilizados na medicina veterinária são extrapolados da medicina humana (Mathews, 2008).

A dipirona é um analgésico, antipirético não opióide com ampla margem de segurança para utilização na gestação. Os relatos da ocorrência de aplasia medular são raros e em geral estão relacionados ao uso crônico. Em relação aos antiinflamatórios não esteroidais, o carprofeno é indicado para tratamento de fêmeas gestantes, enquanto o cetoprofeno e o meloxicam devem ser utilizados com cautela, uma vez que podem atrasar o trabalho de parto por inibição da síntese de prostaglandinas; o fluxinin meglumine é seguro para os fetos, porém a terapia não deve se prolongar devido aos riscos de gastroenterite hemorrágica na fêmea (Spinosa, 2023). Os inibidores seletivos de COX-2 como o firocoxib tem sido amplamente utilizados no tratamento de inflamações associadas a quadros de osteoartrites, porém sua utilização em cadelas gestantes não é recomendada (FDA, 2004).

A administração de anestesia em cadelas gestantes é uma prática que envolve uma série de considerações clínicas e a avaliação individualizada de cada caso, considerando os potenciais riscos e benefícios para a saúde da mãe e dos fetos em desenvolvimento. O uso de anestésicos durante a gestação pode ser necessário por uma série de razões, dentre elas procedimentos cirúrgicos de emergência que podem ser necessários para salvar a vida da mãe e dos fetos. Nestas situações, a anestesia é essencial para permitir a realização do procedimento de forma segura e controle efetivo de dor. Algumas condições médicas podem exigir a realização de exames diagnósticos invasivos, ou tratamentos específicos, e a anestesia pode ser recomendada para garantir o conforto da mãe e também como contenção química para permitir a realização do procedimento (Pascoe; Moon, 2001).

Embora a maioria das gestações em cadelas resulte em parto normal, em algumas situações, a cesariana pode ser indicada devido a complicações no trabalho de parto, ou de forma eletiva para prevenir distocia em raças predispostas (Wydooghe et al. 2013; O'Niel et al., 2017). Nesses casos,

anestesia geral ou regional podem ser empregadas e o protocolo anestésico deve ser executado de modo a garantir a segurança tanto para a parturiente quanto para os filhotes, e a eficiência anestésica, promovendo plano adequado pelo tempo necessário para a realização da cirurgia (Antończyk; Ochota, 2022). Além disso, deve causar pouca depressão nos filhotes, para que estejam vigorosos e apresentem parâmetros normais no pós-parto (Metogo et al., 2021). Também é importante que a recuperação anestésica da fêmea se dê de forma rápida logo após a cirurgia, favorecendo a atenção da mãe aos filhotes (Robertson, 2016).

A maioria dos agentes anestésicos possui alta lipossolubilidade e baixo peso molecular, favorecendo a transferência placentária e atingindo a circulação fetal. Alguns fármacos, como é o caso do propofol, apresentam rápida metabolização e eliminação o que reduz significativamente a exposição dos filhotes intrauterino. A anestesia epidural pode ser empregada com intuito de reduzir a utilização de anestésicos gerais, favorecendo o bem estar e vigor dos filhotes recém-nascidos. É importante que a técnica seja realizada por um profissional capacitado, tomando cuidado para evitar o avanço torácico do bloqueio anestésico que pode causar depressão ou parada respiratória, hipotensão e bradicardia. Os anestésico local mais utilizado é a lidocaína na concentração de 0,5 a 2% sem vasoconstritor (Wiebe; Howard, 2009). A tabela a seguir lista os principais anestésicos utilizados na prática veterinária e seus efeitos em gestantes.

Tabela: Principais Anestésicos em Medicina Veterinária

Classe	Fármaco	Efeito/Recomendação
Anestésicos	Fenotiazínicos	Hipotensão em fêmeas gestantes, diminuição da circulação uterina, hipóxia fetal. Efeito termolítico nos RN
	Benzodiazepínicos	Alto grau de ionização favorece a passagem pela barreira placentária. Depressão respiratória nos fetos.
	Agonista alfa 2	Alta taxa de transferência placentária. Depressão cardiorrespiratória na gestante e nos filhotes. Diminuição da perfusão tecidual.
	Anticolinérgicos	Atravessa rapidamente a barreira placentária e causa taquicardia e excitação

	do SNC nos fetos.
Opioides	Alto grau de ionização. Depressão respiratória e do SNC diretamente proporcional à analgesia.
Barbitúricos	Inibem movimentos respiratórios no feto.
Propofol	Atravessa a barreira placentária mas é rapidamente eliminado pelo feto. Não causa hipotensão em fêmeas submetidas a cesarianas com bloqueio regional.
Etomidato	Não causa distúrbios em paciente cardiopatas. Rápida indução, rápida recuperação.
Agentes inalatórios	Atingem os fetos e causam depressão do SNC diretamente relacionado ao plano anestésico. Associação com propofol reduz a necessidade o uso de anestésicos inalatórios.
Bloqueadores neuromusculares	Alto peso molecular, baixa taxa de transferência placentária.
Anestésicos locais	Melhor vitalidade dos fetos no pós-parto. Dose utilizada para bloqueio local produzem poucos efeitos nos filhotes.

Adaptado Spinosa et al., 2023.

Cadelas gestantes podem ainda enfrentar os mais diversos quadros crônicos ou agudos, necessitando tratamento farmacológico abrangente para atender as demandas da condição clínica associadas às da gestação (Fall et al., 2008; Rebuelto; Loza, 2010). Isso pode incluir a administração de uma variedade de medicamentos, como diuréticos para controlar a retenção de líquidos e a pressão arterial; agentes antiarrítmicos e cardiotônicos para regular o ritmo e melhorar a função cardíaca; mucolíticos e broncodilatadores para aliviar problemas respiratórios; antieméticos; anticonvulsivantes para tratar convulsões em pacientes epiléticos; anticoagulantes para prevenir complicações tromboembólicas; hormônios esteroides e vitaminas (Fall et al., 2008; Tibold e Thuróczy, 2009, Rocha e Arias, 2020). A escolha e a administração desses medicamentos devem ser cuidadosamente avaliadas levando em consideração o estado individual de cada gestante e o potencial impacto na saúde da prole.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos tópicos abordados nesta revisão podemos concluir que a compreensão dos mecanismos fisiológicos e anatômicos da gestação é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas seguras e eficazes. A farmacologia e terapêutica perinatal em cadelas envolvem considerações importantes sobre a gestação, desde o início do ciclo reprodutivo até as avaliações de segurança e impacto nas gestantes e seus descendentes. É fundamental enfatizar que a pesquisa contínua e a estreita colaboração entre veterinários e pesquisadores são elementos essenciais para o avanço de nossa compreensão e prática neste campo da Medicina Veterinária.

6. REFERÊNCIAS

- ADAM, M. P. et al. Evolving knowledge of the teratogenicity of medications in human pregnancy. **American Journal of Medical Genetics**. Part C, Seminars in Medical Genetics, v. 157, p. 175-182, 2011.
- AGUILERA-PADROS, A. et al. Suspected pregnancy-associated meningoencephalitis of unknown origin in a dog. **Veterinary Record Case Reports**, v. 2023.
- AHMED, A. et al. Pregnancy and spontaneous partial abortion associated with salmonella in a dog. **Clinical Theriogenology**, v. 15, 2023.
- AL-ANI, O. A. Drugs in pregnancy. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 13, p. 78-82, 2020.
- ALLEGAERT, K. et al. Perinatal pharmacology. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-3, 2014.
- ALMEIDA, J. A.; RIORDAN, S. M. The safety of pharmacological therapies for gastrointestinal conditions encountered during pregnancy. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 6, p. 493-503, 2007.
- AMANOLLAHI, S. et al. Simultaneous pyometra and pregnancy in a female dog. **Veterinary Record Case Reports**, v. 10, 2022.
- AMBRÓSIO, C. E. **A Barreira Placentária em Cães**. 2004. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

AMBRÓSIO, C. E. et al. Estrutura funicular, vascularização e morfologia placentária em cães e gatos (*Canis familiaris* e *Felis catus*), Linnaeus, 1958. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 2, p. 99-101, 2002.

ANDERSON, G. D. Pregnancy-induced changes in pharmacokinetics. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 44, p. 989-1008, 2005.

ANDRADE, S. E. et al. Medication Exposure in Pregnancy Risk Evaluation Program. **Maternal and Child Health Journal**, v. 16, p. 1349-1354, 2012.

ANTOŃCZYK, A.; OCHOTA, M. Is an epidural component during general anesthesia for caesarean section beneficial for neonatal puppies' health and vitality? **Theriogenology**, v. 187, p. 1-8, 2022.

APPARICIO, M.; VICENTE, W. R. R. **Reprodução e Obstetrícia em Cães e Gatos**, 1ª ed. São Paulo: Editora Medvet, 2015. Vol. 1, 458p.

ARAGÃO, F. F. D.; TOBIAS, A. F. Pharmacological treatment of pain in pregnancy. **Brazilian Journal of Pain**, v. 2, n. 4, 2019.

ARAÚJO, R. A. et al. Safety Assessment of an Oral Therapeutic Dose of Firocoxib on Healthy Horses. **Veterinary Sciences**, v. 10, p. 531, 2023.

AUDUS, K. L. Controlling drug delivery across the placenta. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 161-165, 1999.

BARRETT, J. S.; AZER, N. Gestation-specific changes in the pharmacokinetics of drugs. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, p. 1071-1088, 2003.

BASUKI, W.; RAWLINSON, J. E.; LOTHAMER, C.; WHEELER, R. J.; PRYTHERCH, B. Evaluation of gingivitis in pregnant beagle dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, v. 36, n. 3, p. 179-185, 2019.

BENFIELD, R. D.; NEWTON, E. R.; TANNER, C. J.; HEITKEMPER, M. Cortisol as a biomarker of stress in term human labor. **Biological Research for Nursing**, v. 16, n. 1, p. 64-71, 2013.

BELL, J. U.; ECOBICHON, D. J. The development of kinetic parameters of hepatic drug-metabolizing enzymes in perinatal rats. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 53, n. 4, p. 433-437, 1975.

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período de desenvolvimento. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. (Eds.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023.

BLANCO, P. G. et al. Electrocardiographic changes in normal and abnormal canine pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 252-256, 2012.

BORLAKOGLU, J. T. et al. Alterations in rat hepatic drug metabolism during pregnancy and lactation. **Biochemical Pharmacology.**, v. 46, n. 1, p. 29-36, 1993.

BREITZKA, R. L.; SANDRITTER, T. L.; HATZOPOULOS, F. K. Principles of Drug Transfer into Breast Milk and Drug Disposition in the Nursing Infant. **Journal of Human Lactation**, v. 13, n. 2, p. 155-158, 1997.

BRIDWELL, R. E. et al. Sepsis in Pregnancy: Recognition and Resuscitation. West. **Journal of Emergency Medicine.**, v. 20, n. 5, 2019.

BRÓLIO, M. P. et al. A barreira placentária e sua função de transferência nutricional. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.**, v. 34, n. 4, p. 222-232, 2010.

BROUSSARD, C. N.; RICHTER, J. E. Nausea and vomiting of pregnancy. **Gastroenterology Clinics of North America.**, v. 27, n. 1, p. 123-151, 1998.

BRUCKER, M. C.; KING, T. L. The 2015 us food and drug administration pregnancy and lactation labeling rule. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 62, n. 3, p. 308-316, 2017.

CAMARGO, E. L. R. A. et al. Comportamento materno: Uma revisão da inter-relação com a toxicologia do desenvolvimento em roedores. **Cad. Pós-Grad. Distúrb. Desenv.**, v. 17, n. 1. Disponível em: <https://editorarevistas.mackenzie.br/index.php/cpgdd/article/view/11327>. Acesso em: 30 de agosto de 2023.

CAVALLI, R. C.; BARALDI, C. O.; CUNHA, S. P. Transferência placentária de drogas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.**, v. 28, n. 9, p. 557-564, 2006.

CHAPHEKAR, N. et al. Maternal-Fetal Pharmacology of Drugs: A Review of Current Status of the Application of Physiologically Based Pharmacokinetic Models. **Frontiers in Pediatrics.**, v. 9, 2021.

CONCANNON, P. W. Canine Pregnancy: Predicting Parturition and Timing Events of Gestation. In: CONCANNON, P. W.; ENGLAND, E.; VERSTEGEN, J. **Recent Advances in Small Animal Reproduction**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2000.

CONCANNON, P.W.; MCCANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.39, p.3-25, 1989.

CONCANNON, P. W. Reproductive cycles of the domestic bitch. **Animal Reproduction Science.**, v. 124, p. 200-210, 2011.

CORNELIUS, A.J.; MOXON, R.; RUSSENBERGER, J.; HAVLENA, B.; CHEONG, S.H. Identifying risk factors for canine dystocia and stillbirths.

Theriogenology. Aceito para publicação, 2019.

DEFREITAS, M. et al. Educational review: The impact of perinatal oxidative stress on the developing kidney. **Frontiers in Pediatrics**., v. 10, 2022.

DEJNEKA, G. et al. Dystocia after unwanted mating as one of the risk factors in non-spayed bitches—a retrospective study. **Animals**, v. 10, n. 9, p. 1697, 2020.

DOMOSLAWSKA, A. et al. Oral folic acid supplementation decreases palate and/or lip cleft occurrence in Pug and Chihuahua puppies and elevates folic acid blood levels in pregnant bitches. **Polish Journal of Veterinary Sciences**., v. 16, n. 1, 2013.

EILTS, B.E.; DAVIDSON, A.P.; HOSGOOD, G.; PACCAMONTI, D.L.; BAKER, D.G. Factors affecting gestation duration in the bitch. **Theriogenology**, v.64, p.242-251, 2005.

FALL, T. et al. Gestational diabetes mellitus in 13 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**., v. 22, n. 6, p. 1296-1300, 2008.

FARIAS, A. Anestesia em pacientes gestantes. In: APPARÍCIO, M.; VICENTE, W.R.R. **Reprodução e Obstetrícia Veterinária em Cães e Gatos**. 1. ed. São Paulo: MedVet, 2015. p. 247-256.

FARLEY, A. et al. Dynamics of thymus organogenesis and colonization in early human development. **Development**, v. 140, n. 9, p. 2015-2026, 2013.

F.D.A. (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). Freedom of Information Summary. In: **NADA 141-250**. Previcox Chewable Tablets—Firocoxib. Rockville, MD, USA, 2004.

F.D.A. (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). Summary: Content and Format of Labeling for Human Prescription Drug and Biological Products; Requirements for Pregnancy and Lactation Labeling; Final Rule. Docket I N°. **FDA-2014-D-1551**, 2014.

FERRARI, D. et al. Concentration of carprofen in the milk of lactating bitches after cesarean section and during inflammatory conditions. **Theriogenology**, v. 181, p. 59–68, 2022.

FERREIRA, D.; SOUZA, M. H. Bioelectrical impedance spectroscopy for the assessment of body fluid volumes of term neonates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**., v. 37, n. 11, p. 1595-1606, 2004.

FOSSUM, T.W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo 1º ed., Roca; 2001.

FRAGA, L. R.; DIAMOND, A. J.; VARGESSON, N. Thalidomide and birth defects. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1-11 2016.

FREDERIKSEN, M. C. Physiologic changes in pregnancy and their effect on drug disposition. **Seminars in Perinatology**, v. 25, n. 3, p. 120–123, 2001.

FUKUSHIMA, A. R.; AZEVEDO, F. A. História da Toxicologia. Parte I – breve panorama brasileiro. **Revinter**, v. 1, n. 1, p. 2-32, 2008.

GAYNOR, J. S.; MUIR III, W. W. **Handbook of Veterinary Pain Management**, 2nd Edition. Mosby Elsevier, 2009.

GERENUTTI, DE-SOUZA SPINOSA H.; BERNARDI, M.M.. Algumas considerações sobre a toxicologia do desenvolvimento. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 1, p. 27-29, 1991.

GERENUTTI, M. et al. Reproductive performance and embryotoxicity of rats exposed to carbamazepine. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 509-514, 2008.

GENDLER, A.; BROURMAN, J.D.; GRAF, K.E. Canine Dystocia: Medical and Surgical. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian-North American**. v.29, p.551-563, 2007.

GOLDSMITH, L. T.; WEISS, G.; STEINMETZ, B. G. Relaxin and its role in pregnancy. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 24, n. 1, p. 171–186, 1995.

HAMMERMAN, M. R. Organogenesis of kidney and endocrine pancreas. **Organogenesis**, v. 3, n. 2, p. 59-66, 2007.

HEGEWALD, M. J.; CRAPO, R. O. Respiratory physiology in pregnancy. **Clinics in Chest Medicine**, v. 32, n. 1, p. 1–13, 2011.

HIKKADUWA KORALEGE, R. S.; PERERA, N. Toxicity testing, developmental. Reference Module in Biomedical Sciences. DOI: 10.1016/b978-0-12-824315-2.01051-4.

HINDERER, J. et al. Progesterone Concentrations during Canine Pregnancy. **Animals**, v. 11, 2021.

HOLLINSHEAD, F.; HANLON, D. Normal progesterone profiles during estrus in the bitch: A prospective analysis of 1420 estrous cycles. **Theriogenology**, v. 125, Feb, p. 37–42, 2019.

IVANOVA, C.; GEORGIEV, P. Pregnancy in the Bitch – A Physiological Condition Requiring Specific Care – Review. **Tradition and Modernity In Veterinary Medicine** v. 3, n.1. p 77-82, 2018.

JAIN, L. Perinatal Pharmacology at Crossroads. **Clinics in Perinatology**, v. 46, n. 2, xv-xvi, 2019.

JESUS, S. M. D.; SANTANA, R. S.; LEITE, S. N. The organization, weaknesses, and challenges of the control of thalidomide in Brazil: a review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, e0008329, 2020.

KIM, J.; SCIALLI, A. R. Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. **Toxicological Sciences**, v. 122, n. 1, p. 1-6, 2011.

KONDE, A. M.; GITAU, G.K.; KIPTOON, J.; GAKUYA, D. Puppy morbidity and mortality among breeding kennels in Nairobi, Kenya. **Jacobs Journal of Veterinary Science and Research**, v. 1, p 19-25, 2015.

KOSHIMICHI, H. et al. Título do artigo. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 39, n. 12, p. 2370-2380, 2011.

KOWALEWSKI, M. P. Selected Comparative Aspects of Canine Female Reproductive Physiology. **Encyclopedia of Reproduction**, p. 682–691, 2018.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct, and data interpretation. **Mutation Research**, v. 455, p. 155-166, 2000.

KUIPER-MAKRIS, C. et al. Perinatal nutritional and metabolic pathways: early origins of chronic lung diseases. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 2021.

LAFFAN, S. B.; TASSINARI, M. S. **Teratology**, 2017, Primer, 3rd Edition. Disponível em: <<https://www.birthdefectsresearch.org/primer/PrimerPDF/How-are-New-Medicines-Evaluated-for-Developmental-Toxicity.pdf>
www.teratology.org/primer>. Acessado em 02 de setembro de 2023.

LAILLER, G. et al. Aspirin for the prevention of early and severe pre-eclampsia recurrence: a real-world population-based study. **Drugs**, v. 83, n. 5, p. 429-437, 2023.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LEEK J.C., ARIF H. Pregnancy Medications. In: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507858/>.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental Structure: In a Comparative Aspect. **Placenta**, v. 102, p. 122-134, 1994. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1211275>.

LIU, Y. Interrenal organogenesis in the zebrafish model. **Organogenesis**, v. 3, n. 1, p. 44-48, 2007.

LOGUE, O. C.; GEORGE, E. M.; BIDWELL, G. L. Preeclampsia and the brain:

neural control of cardiovascular changes during pregnancy and neurological outcomes of preeclampsia. **Clinical Science.**, v. 130, n. 16, p. 1417-1434, 2016.

LUFT, J.; BODE, G. Integration of safety pharmacology endpoints into toxicology studies. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 16, n. 2, p. 91–103, 2002.

LUZ, M.R.; FREITAS, P.M.C.; PEREIRA, E.Z. Gestação e parto em cadelas: fisiologia, diagnóstico de gestação e tratamento das distocias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.29, n.3/4, p.142-150, jul./dez. 2005.

MALIK, S.; COHEN, P. Thalidomide—Then and Now: Case Report of a Woman with Thalidomide Embryopathy and Review of Current Thalidomide Uses. **Cureus**, v. 13, n. 7, e17070, 2021.

MAKRIS, S. L. et al. Current and future needs for developmental toxicity testing. Birth Defects Research Part B: **Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 92, n. 5, p. 384-394, 2011.

MARTINEZ, M.; MODRIC, S. Patient Variation in Veterinary Medicine: Part I. Influence of Altered Physiological States. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 33, n. 3, p. 213–226, 2010.

MARTINEZ, M. N.; MARTIN, T.; CONNER, D. S. Challenges associated with the evaluation of veterinary product bioequivalence: an AAVPT perspective. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.**, v. 25, n. 3, p. 201-220, 2002.

MARTINS, J. A. P. **Manual de Obstetrícia**. São Paulo: EDUSP, 1982.

MATA, J.; PAPICH, M. G. Considerações Farmacológicas em pacientes jovens. In: **Pediatria em Pequenos Animais**. Editado por Peterson, M.E.; Kutzler, M.A.. Rio de Janeiro, 1º ed., 2011, p. 233-243.

MATAR, K. M. et al. Effects of pregnancy on the pharmacokinetics of lamotrigine in dogs. **Epilepsia**, v. 40, n. 10, p. 1353-1356, 1999.

MATHEWS, K. Pain management for the pregnant, lactating, and neonatal to pediatric cat and dog. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, n. 6, p. 1291–1308, 2008.

MATSUI, D. Therapeutic drug monitoring in pregnancy. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 34, n. 5, p. 507-511, 2012.

METOGO, J. et al. General versus regional anesthesia for cesarean section indicated for acute fetal distress: a retrospective cohort study. **BMC Anesthesiology**, v. 21, n. 1, 2021.

MOON, P., ERB, H., LUDDERS, J., GLEED, R., & PASCOE, P. Perioperative

risk factors for puppies delivered by cesarean section in the United States and Canada. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v.36, n.4, p.359–368, 2000.

MOR, G. et al. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. **Annals of the New York Academy of Sciences Journal**, v. 1221, p. 80-87, 2011.

NAKAMURA, Y.; FUKAMI, K. Roles of phospholipase C isozymes in organogenesis and embryonic development. **Physiology**, v. 24, n. 6, p. 332-341, 2009.

OLIVEIRA, F. et al. The development of the integumentary system in dogs. **Journal of Cytology and Histology**, S3, 2015.

OLIVEIRA, J. O. D. et al. Fatores associados ao estabelecimento da microbiota intestinal neonatal – um estudo de evidências. **Diversitas Journal**, v. 5, n. 4, p. 2868-2880, 2020.

O'NEILL, D. G. et al. Canine dystocia in 50 UK first-opinion emergency care veterinary practices: clinical management and outcomes. *Veterinary Record*, v. 184, n. 13, p. 409-409, 2019

PACIFICI, G. M.; NOTTOLI, R. Placental Transfer of Drugs Administered to the Mother. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 28, n. 3, p. 235-269, 1995.

PALMISANO, P. A.; POLHILL, R. B. Fetal Pharmacology. **Pediatric Clinics of North America**, v. 19, n. 1, p. 3-20, 1972.

PAPICH, M. G.; DAVIS, L. E. Drug therapy during pregnancy and in the neonate. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 16, n. 3, p. 525–538, 1986.

PASCOE, P. J.; MOON, P. F. Periparturient and neonatal anesthesia. The Veterinary Clinics of North America. **Small Animal Practice**, v. 31, n. 2, p. 315-340, 2001.

PAYNE-JOHNSON, M. et al. Efficacy of selamectin administered topically to pregnant and lactating female dogs in the treatment and prevention of adult roundworm (*Toxocara canis*) infections and flea (*Ctenocephalides felis felis*) infestations in the dams and their pups. **Veterinary Parasitology**, v. 91, n. 3-4, p. 347–358, 2000

PEREIRA, K. H. N. P. et al. Neonatology: Topics on Puppies and Kittens Neonatal Management to Improve Neonatal Outcome. **Animals**, v. 12, 2022.

PIERI, N. C. G. et al. Comparative development of embryonic age by organogenesis in domestic dogs and cats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 4, p. 625-631, 2015.

PRETZER, S. D. Canine embryonic and fetal development: a review. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 300–303, 2008.

PRITCHARD, J. A.; MCDONALD, P. C. **Obstetrícia de Williams**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980.

PROBST, C. W.; WEBB, A. I. Postural influence on systemic blood pressure, gas exchange, and acid/base status in the term-pregnant bitch during general anesthesia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, p. 1963-1965, 1983.

PUGSLEY, M. K.; AUTHIER, S.; CURTIS, M. J. Principles of safety pharmacology. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 7, p. 1382-1399, 2008. DOI: 10.1038/bjp.2008.280.

PYKE, M.; SHUTT, L. E. The management of nonobstetric pains in pregnancy. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 28, n. 1, p. 54-57, 2003. DOI: 10.1053/rapm.2003.50006.

REBUELTO, M.; LOZA, M. I. Antibiotic treatment of dogs and cats during pregnancy. **Veterinary Medicine International**, 2010. DOI: 10.4061/2010/385640.

ROBERTSON, S. Anaesthetic management for caesarean sections in dogs and cats. In **Practice**, v. 38, p. 327-339, 2016.

ROBINSON, N. E. Transporte de Oxigênio Fetal e Neonatal. In: CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p 533-538.

ROCHA, N. L. F. C.; ARIAS, M. V. B. Paracostal eventration of a pregnant uterus in a bitch. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 48, 2020.

RODIEUX, F. et al. Effect of kidney function on drug kinetics and dosing in neonates, infants, and children. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 54, n. 12, p. 1183-1204, 2015.

RUBIN, J. D.; FERENCZ, C.; LOFFREDO, C. Use of prescription and non-prescription drugs in pregnancy. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 46, p. 581–589, 1993.

RYU, R. J. et al. Prednisone pharmacokinetics during pregnancy and lactation. The **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 58, n. 9, p. 1223-1232, 2018.

SAMPAIO, R.L.; SAMPAIO, R.; LACERDA, M.S. Ruptura de útero em cadelas gestantes após a aplicação de ocitocina: relato de 2 casos. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (Conbravet)**, Gramado. v. 19, 2002.

SASTRY, B. V. Techniques to study human placental transport. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 38, n. 1, p. 17–39, 1999.

SAUNDERS, N. R.; LIDDELOW, S. A.; DZIEGIELEWSKA, K. M. Barrier mechanisms in the developing brain. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, 2012.

SEVENE, E. et al. Drug exposure and pregnancy outcome in Mozambique. **Pediatric Drugs**, v. 14, n. 1, p. 43-49, 2012.

SHARMA, A. et al. Combination of fluoride and endosulfan induced teratogenicity and developmental toxicity in Swiss albino mice exposed during organogenesis. **Toxicology and Industrial Health**, 2019.

SHIMIZU, T. et al. Incidence for transuterine migration of embryos in the dog. Japanese **Journal of Veterinary Science**, v. 52, p. 1273-1275, 1990.

SHORT, C. R.; DAVIS, L. E. Perinatal Development Of Drug-Metabolizing Enzyme Activity In Swine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 174, n. 2, p. 185-196, 1970.

SHORT, C. R.; STITH, R. D. Perinatal development of hepatic microsomal mixed function oxidase activity in swine. **Biochemical Pharmacology**, v. 22, n. 11, p. 1309-1319, 1973.

SIFAKIS, S.; PHARMAKIDES, G. Anemia in pregnancy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 900, p. 125–136, 2000.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 7. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2023.

STARODUBTSEVA, N. et al. Transplacental Therapeutic Drug Monitoring in Pregnant Women with Fetal Tachyarrhythmia Using HPLC-MS/MS. **Internal Journal of Molecular Sciences**, v. 24, 2023.

TAN, E. K.; TAN, E. L. Alterations in physiology and anatomy during pregnancy. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 27, p. 791-802, 2013.

TAYMAN, C.; RAYYAN, M.; ALLEGAERT, K. Neonatal pharmacology: extensive interindividual variability despite limited size. **The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics**, v. 16, n. 3, p. 170-184, 2011.

THATCHER, M.-J. D. et al. Canine conceptus appearance and de novo protein synthesis in relation to the time of implantation. **Theriogenology**, v. 41, p. 1679-1692, 1994.

TIBOLD, A.; THURÓCZY, J. Progesterone, oestradiol, fsh and lh concentrations in serum of progesterone-treated pregnant bitches with suspected luteal insufficiency. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 129-132, 2009.

TSUITSUI, T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. v.39, p.269-275,

1989.

TULCHINSKY, D.; LITTLE, B. A. **Maternal Fetal Endocrinology**. Philadelphia: Saunders, 1994.

VANNUCCHI, C. et al. Perfil de proteínas plasmáticas em cadelas gestantes e não gestantes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 8, p. 781-786, 2016.

VEIGA, G. A. L. et al. Endocrinologia da gestação e parto em cadelas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 1, p. 3-10, 2009.

VERMA, R. P.; LONDON, P. Non-invasive bedside estimation of nutrition accretion and extracellular water volume in preterm neonates during the first three weeks of life. **Journal of Pediatrics & Neonatal Care**, v. 2, n. 1, 2015.

VERONESI, M.; BATTOCCHIO, M.; MARINELLI, L.; FAUSTINI, M.; KINDAHL, H.; CAIROLI, F. Correlations among body temperature, plasma progesterone, cortisol and prostaglandin f2 α of the periparturient bitch. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 49, n. 5, p. 264-268, 2002.

VERONESI, M. Assessment of canine neonatal viability—the apgar score. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 51, s.1, p. 46-50, 2016. <https://doi.org/10.1111/rda.12787>

VIEIRA, G. D. D.; SOUSA, C. M. D. Aspectos celulares e fisiológicos da barreira hematoencefálica. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 1, n. 4, p. 166, 2013.

VOORWALD, F.A.; TIOSSO, C.F. Distocias. In: **Reprodução e Obstetrícia Veterinária em Cães e Gatos**. Editado por APPARÍCIO, M.; VICENTE, W.R.R. São Paulo 1º ed., MedVet, 2015, p.203-217.

VUILLEMIN, M.; PEXIEDER, T. Normal stages of cardiac organogenesis in the mouse: i. development of the external shape of the heart. **American Journal of Anatomy**, v. 184, n. 2, p. 101-113, 1989.

WIEBE, V. J.; HOWARD, J. P. Pharmacologic advances in canine and feline reproduction. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 24, n. 2, p. 71–99, 2009.

WILLEMSE, T. W.; LAMB, V.; KELLY, D. J. Pregnancy-associated immune-mediated polyarthrititis in a dog. **Veterinary Record Case Reports**, v. 7, n. 4, 2019.

WINTERHAGER, E.; GELLHAUS, A. Transplacental nutrient transport mechanisms of intrauterine growth restriction in rodent models and humans. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 2017.

WSAVA. Pregnant or lactating patients: What do I need to know about treating them? Disponível em: <https://wsava.org/wp-content/uploads/2020/01/Pregnant->

or-lactating-patients.pdf. Acesso em: data de acesso 25 de agosto de 2023.

WISE, A. Small Animal Neonatology. **Veterinary Record.**, v. 172, n. 7, p. 187-187, 2013.

Wu, T., Shi, Z., Song, H., Li, Y., & Li, J. H. (2018). Cytotoxicity of local anesthetics on rabbit adipose-derived mesenchymal stem cells during early chondrogenic differentiation. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 16(4), 2843–2850. DOI: 10.3892/etm.2018.6539

YUE, M. et al. Pharmacokinetics of antidepressants in pregnancy. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 63, Suppl. 1, 2023.

CAPÍTULO 2- APPLICATION OF THE MICRONUCLEUS ASSAY FOR EVALUATING TOXICITY IN CANINE ELECTIVE CESAREAN SECTION PROCEDURES EMPLOYING TWO ANESTHETIC PROTOCOLS

Renatha Almeida de Araújo¹, Silvio Almeida-Junior², Ricardo de Andrade Furtado² and Maricy Apparício^{3*}

¹ Department of Pathology Reproduction and One Health, School of Agricultural and Veterinary Studies, São Paulo State University, FCAV/UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo D. Castellane s/n., Jaboticabal 14884-900, SP, Brazil; j.rocha@unesp.br (J.D.R.J.)

² Universidade de Franca, Avenida Dr. Armando Salles de Oliveira, 201 – Parque Universitário, 14404-600, Franca, São Paulo, Brazil

³ Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Rua Professor Doutor Walter Mauricio Correa, s/n., Botucatu 18618-681, SP, Brazil; maricy.apparicio@unesp.br (M.A.)

* Correspondence:: maricy.apparicio@unesp.br

ABSTRACT: Cesarean section in dogs, although common, requires caution in the selection and application of anesthetics to ensure maternal and fetal safety during the procedure. The assessment of the toxicity of employed anesthetic protocols is a critical element in veterinary practice. The utilization of the micronucleus assay in rodents, a recognized technique for investigating genetic damage induced by chemical or physical agents, is capable of evaluating the safety of pharmaceutical products 24 to 48 hours after the administration of the tested substance by collecting bone marrow or peripheral blood samples to prepare hematological slides. Cytotoxicity is assessed based on the ratio between immature erythrocytes (IE) and the total number of erythrocytes. The increase of the IE ratio highlights the cytotoxic potential of the tested substance. In this study, our initial objective was to adapt the methodology for application in canine species, aiming to investigate potential cellular-level effects of substances applied to dogs during the perinatal period. Additionally, we aimed to analyze and compare the toxicity of two anesthetic protocols employed in dogs undergoing elective cesarean section, using the micronucleus assay as a sensitive tool to identify possible genetic damage. 14 bitches in the final third of gestation and their litters were used, divided into 3 groups. The first group, comprised of 6 animals, was used for technique adaptation. The remaining 8 dogs were randomly allocated to 2 groups: Lidocaine and Ropivacaine, receiving anesthetic induction with 3 mg kg⁻¹ of propofol and maintenance with isoflurane vaporization. In the Lidocaine group, epidural anesthesia was administered with 2% lidocaine at a dose of 2 mg kg⁻¹; in the Ropivacaine group, a dose of 1.5 mg kg⁻¹ of 1% ropivacaine was administered. During the adaptation phase of the evaluation protocol, the animals responded consistently to exposure to the anesthetic procedure, the proposed protocol was easily executed with adaptations for the canine species. There was no genotoxic or cytotoxic effect in either group according to the applied methodology.

1. INTRODUCTION

Elective cesarean section stands as a prevalent surgical intervention among brachycephalic breeds, necessitating careful consideration of anesthetic methodologies to ensure optimal outcomes. Anesthetic induction, a pivotal aspect of cesarean procedures, demands thoughtful selection to mitigate potential risks such as elevated fetal death rates. Recommended

practices advocate for injectable anesthesia, particularly utilizing propofol induction followed by isoflurane maintenance, to establish safe and effective anesthetic plan for cesarean deliveries [1].

Epidural anesthesia, a widely adopted technique in obstetric settings, involves the administration of analgesic or local anesthetic drugs into the epidural space. Renowned for its simplicity, effectiveness, cost-efficiency, and safety when executed appropriately, epidural anesthesia in cesarean sections reduces the reliance on inhaled anesthetics during surgery and postoperative analgesic rescue [2]. Nevertheless, careful consideration of systemic effects is crucial to minimize potential adverse reactions in both the pregnant bitch and offspring.

Lidocaine, an amino-amide local anesthetic, poses concerns due to its ability to cross the placental barrier, potentially influencing fetal well-being cesarean delivery [3]. In contrast, ropivacaine, another amide group member, which also crosses the placental barrier, offers a reversible blockade of nerve impulses with enhanced potency and prolonged duration compared to lidocaine, while exhibiting lower cardiotoxic effects than bupivacaine [4].

Despite the safety of epidural anesthesia, its application in pregnant females demands consideration to physiological alterations, including blood vessels engorgement in the vertebral canal, potentially leading to increased systemic absorption and heightened drug availability for the offspring in the uterine environment [5].

The evaluation of anesthetic protocols intended for pregnant females requires meticulous attention to the physiological peculiarities of these animals and their fetuses. Micronucleus tests, widely employed in analyzing genotoxic and cytotoxic potential, offer insights into pharmaceutical safety. Genotoxicity refers to the ability of a substance to cause damage to the genetic material of cells, potentially leading to mutations and cancer. This potential depends, among other factors, on the exposure time and the dose used. Cytotoxicity is the ability of a substance to be toxic to cells, potentially leading to cell death. The relationship between cytotoxicity and genotoxicity is relevant because substances that are cytotoxic may also be genotoxic [6].

In vivo micronucleus assays, a key component of genotoxicity evaluations required for pharmaceutical product registration, have traditionally involved invasive techniques, necessitating euthanasia and risking sample contamination [7]. To address these limitations, peripheral blood micronucleus assays offer a conservative alternative. This technique involves collecting blood samples after a single dose administration of the tested substance, typically 24 to 48 hours prior. Histological slides of blood smears are prepared, and the cytotoxicity index is determined by the ratio of polychromatic erythrocytes to normochromatic erythrocytes. [8].

Despite existing anesthetic protocols for veterinary obstetric management, a gap exists in specific pharmacological safety information for agents used in canine cesareans and their potential toxicity to offspring. This study aims to adapt the peripheral blood micronucleus assay for canine species, particularly neonates, and to compare two anesthetic protocols applied to dogs undergoing elective cesarean section.

2. MATERIAL AND METHODS

This project was approved by the Ethics Committee for Animal Use (CEUA) of the Faculty of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine – Unesp – Campus Jaboticabal, under protocol 011302/19.

2.1 Animals

Fourteen pregnant bitches were included in the study, comprising 2 Chow-Chows, 6 English Bulldogs, and 6 French Bulldogs. The age of the dogs ranged from 1 to 8 years, and they were all at full term gestation, exhibiting diverse weights. The animals were divided into three groups along with their respective offspring.

In the first experiment, group (A) consisted of 6 pregnant female dogs and their offspring (n=25), undergoing cesarean delivery following the experimental anesthetic protocol. The data obtained from this group were pivotal in the initial adaptation phase of the technique. The remaining animals were allocated to two distinct groups for the second experiment: Lidocaine (L), which included 4 female dogs and 16 offspring, and Ropivacaine (R), composed of 4 female dogs and 21 offspring.

Prior to elective c-section, thorough evaluations were conducted on all pregnant females to ascertain the optimal timing, ensuring the maturity of the offspring and the overall health of the mothers.

2.2 Owners

Owners who agreed to participate in the project signed a consent form (ANNEX 1), confirming their awareness of the inherent risks associated with the experimental protocols. Additionally, they pledged to bring their pregnant dogs for scheduled evaluations and agreed not to administer any pharmacological treatment without prior knowledge and approval from the research team.

2.3 Experimental Protocol

All animals underwent comprehensive prenatal monitoring at the Animal Obstetrics and Reproduction Service (SORA) of the Governor Laudo Natel Veterinary Hospital of FCAV Unesp- Jaboticabal. The assessment of pregnant dogs encompassed a detailed physical examination, including measurements of heart rate, respiratory rate, rectal temperature, and mucous membrane color. Additionally, laboratory tests, such as complete blood count and serum biochemistry (urea, creatinine, ALT, total proteins) were performed. Dogs that showed no alterations in these parameters were considered healthy and included in the experiment. .

Gestational age was determined by considering both the mating date (within the range of 58 to 63 days) and ultrasound examination. The ultrasound evaluation included assessments of amniotic fluid levels, the presence of peristalsis, reduction in fetal heart rate, and parietal diameter for estimating gestational age. The timing for cesarean sections was meticulously determined based on these evaluations, specifically observing the decline in rectal temperature (0.5 to 1°C). Subsequently, the dogs were scheduled for elective cesarean delivery and underwent anesthetic induction with 3mg/kg of propofol for orotracheal intubation, followed by anesthetic maintenance with Isoflurane.

For groups A and L, dogs received 2% lidocaine at a dose of 2mg/kg via epidural route, while those in group R received 1.5mg/kg of 1% ropivacaine.

2.4 Selection Criteria

Females displaying indications of dystocia were excluded from the experimental group. Similarly, newborns exhibiting any type of malformation or attaining an Apgar score below 8, according to the evaluated parameters [9], necessitating pharmacological intervention for cardiopulmonary stabilization post- birth, were also excluded from the study.

2.5 Neonatal Evaluation

Neonatal care was conducted by a proficient team, adhering to a well-defined cardiopulmonary resuscitation protocol. This protocol encompassed essential procedures such as airway cleaning, removal of any obstructions in thenostrils and mouth of each newborn puppy, vigorous chest rubbing to stimulate breathing, and meticulous drying with compresses to avert hypothermia.

For efficient identification of the birth order, each puppy was adorned with color-coded ribbons, consistently arranged in a predetermined sequence of colors (red, orange, yellow, green, blue, indigo, violet, white, and black). The assessment of the puppies utilized a modified Apgar scale tailored for veterinary purposes [9]. Parameters considered included mucous membrane color, heart rate, respiratory rate, reflex irritability, mobility, sucking reflex,

vocalization, and rectal temperature. This evaluation was promptly conducted immediately after the puppy's the birth and repeated at 5 minutes post-birth (M0 and M5).

2.7 Toxicity Evaluation

Peripheral blood samples were obtained from the mothers through ear marginal vein puncture, before anesthetic induction (0h), serving as baseline control, and 48 hours post-delivery (48h). For the puppies, the initial collection (0h) from the plantar cushion occurred immediately after the initial neonatal handling, followed by a second collection 48 hours after birth (48h). In the case of group A, which comprised the technique adaptation phase, mirroring the procedures of the Lidocaine Group, only the 0h samples were collected. A total of 25 healthy puppies, meeting the selection criteria were derived from the evaluation of six litters and deemed suitable for participation in the experiment.

Punctures were performed using a disposable sterile metal lancet, and the resulting blood drops were directly deposited on glass slides for immediate blood smear preparation. All samples were duplicated. The slides were air-dried, fixed with absolute methanol, and stored for laboratory submission. The setup for sample collection and slide preparation is illustrated in Figure 1, while Figure 2 depicts the blood drop deposition on the slide. Following staining with Giemsa, the slides were analyzed under an optical microscope with a 100x objective under immersion.

The peripheral blood micronucleus assay protocol was adapted from the OECD 474 guidelines (2016) [10]. A total of 4000 immature erythrocytes were analyzed per animal to determine the frequency of micronucleated immature erythrocytes, indicating the genotoxicity rate. Citotoxicity was assessed by calculating the immature erythrocyte ratio (PCE) to total erythrocytes (NCE) through the analysis of 2000 erythrocytes.

Figure 1: Collection table showing sterile slides, coverslips, sterile metal lancets, and a puppy.



Figure 2: Blood collection by puncture of the plantar cushion for slide preparation.



2.7 Statistical Analysis

Data with Gaussian distribution were statistically analyzed using a paired randomized T-test and their respective 'p-value,' with the calculation of the minimum significant difference for $\alpha = 0.05$. Each treatment was compared with its baseline time, 0h.

3. RESULTS

During the adaptation phase, specifically in the evaluation of Group A, no significant differences were observed among offspring born from different litters or within the same litter. This uniform response across litters and even among siblings within the same litter implies a consistent reaction to exposure to the anesthetic, regardless of their familial or litter origin. The proposed protocol was easily executed with adaptations for the canine species

Figure 3 displays the data on the immature red blood cell to total cell ratio. The overall results, comparing the time points 0h and 48h, reveal that in the group receiving ropivacaine, the treatment resulted in a slight decrease in the ratio of immature red blood cells to total cells, but it was not indicative of cytotoxic effect. When analyzing the data separately, a p-value of 0.87 is observed for the mothers, whereas for the offspring, a p-value of 0.012 is noted. The group administered lidocaine showed no significant alteration in the immature red blood cell to total cell ratio, suggesting the absence of cytotoxicity according to the applied methodology.

Figure 3: Ratio of immature erythrocytes to the total erythrocytes analyzed for the Ropivacaine and Lidocaine groups at 0h and 48h timepoints

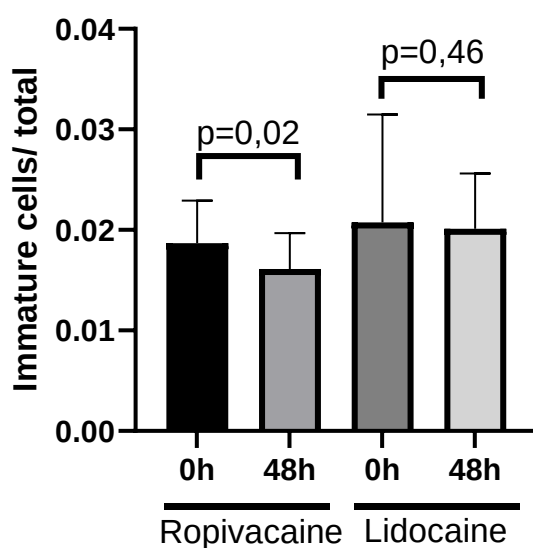
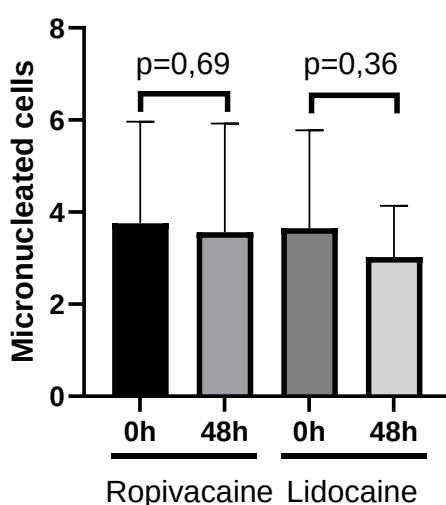


Figure 4 illustrates the data depicting the frequency of micronucleated immature erythrocytes. The comparison between the time points 0h and 48h reveals that neither of the administered anesthetic protocols induced a significant alteration in the frequency of micronucleated immature erythrocytes. This outcome suggests the absence of genotoxic effects associated with the anesthetic interventions.

Figure 4: Frequency of micronucleated immature erythrocytes observed in the Ropivacaine and Lidocaine groups at 0h and 48h.



4. DISCUSSION

Micronucleus assays with mammalian erythrocytes were initially developed to assess samples from the marrow of young adult animals. Given that erythrocyte production primarily occurs in the marrow, it represents the tissue most susceptible to genetic damage caused by specific agents [11]. The widespread applicability and practicality of this test have rendered it the preferred methodology for assessing *in vivo* genetic damage [8]. However, the invasiveness of the method restricts its utility in clinical trial contexts where euthanasia of the experimental animal is not recommended. Consequently, alternative techniques have been developed to optimize the use of this test model [12].

A crucial aspect of the peripheral blood micronucleus assay methodology is the splenic selection process that occurs in adult animals. As a result, micronucleated cells tend to be retained in the spleen, complicating the evaluation of micronucleus frequency in this type of substrate. Yet, a study involving 5-day-old rats demonstrated that utilizing neonates is a practical approach for detecting *in vivo* genotoxicity, as splenic selection at this stage is still inefficient, rendering the results more reliable [13].

Perinatal toxicological studies in dogs represent a relatively underexplored area of research, with much of the data extrapolated from knowledge obtained in humans and laboratory animals [14, 15]. The adaptation of an established technique in rodents to the canine species, particularly in neonates, opens up possibilities for its application as a research methodology. In our study, the collection, processing, and analysis of samples proved to be easily executable. Traditional Giemsa staining used in micronucleus research in rodent erythrocytes [16] was successfully employed. The results obtained in dogs indicate that the technique is suitable for application in this species compared to its application in rodents [17].

The evaluation of the toxicity of anesthetics used in cesarean sections holds significance in the field of perinatal pharmacology, providing data that allow for better-informed decision-making by veterinary medical professionals [18]. The use of minimally invasive anesthetic protocols aims to ensure minimal impact on offspring and rapid recovery for the mother, enabling her to assume primary care for the litter in the shortest time possible post-partum [19].

Local anesthetics are widely used in cesarean sections to perform epidural regional blocks. Despite their relative safety, they tend to reach systemic circulation and come into contact with the fetuses. This is because pregnancy causes engorgement of the vascular region and decreases the epidural space, which can further increase absorption [20].

An *in vitro* study investigating the cytotoxicity of local anesthetics from the amide group revealed that ropivacaine was the local anesthetic causing the least cytotoxicity at the clinical dose. Concentration and exposure time were also determining factors for increased cytotoxicity, except for lidocaine, whose observed cytotoxic effect was very high even at low concentrations [21]. In contrast, our results indicated a trend toward ropivacaine toxicity after 48 hours of observation. The short exposure time may explain this finding. During cesarean sections, the fetal exposure time to the drugs used in the mother is relatively short, not exceeding 1 hour in surgeries without complications. The collection protocol used follows the recommendations of OECD 474 (2016) [10], stating that the first sample should be collected within 24 hours of exposure to the tested agent, thus serving as its own negative control, as the medullary response takes more than 24 hours to generate micronucleated erythrocytes when an alteration occurs.

Another *in vitro* study employing rabbit mesenchymal cells subjected to treatment with local anesthetics, including lidocaine and ropivacaine, indicated a lower cytotoxic effect of the former [22]. However, another study examining the effects of lidocaine on rat retinal ganglion cells *in vitro* and in a modified *in vivo* assay found toxic results in both tests. Lower doses were better tolerated (0.5 mM and 1.0 mM), considered safe, while higher doses (2.0, 6.0, and 12.0 mM) caused cytotoxic effects directly proportional to the dose used [23].

Lidocaine is widely used as an anesthetic agent in obstetrics. A study evaluating placental transfer of lidocaine after maternal paracervical block determined that the anesthetic could be detected in the mother's bloodstream approximately 1 minute after infusion and in the fetuses after 3 minutes, reaching its peak around 9 minutes after infusion [24]. This indicates that regional block for cesarean section, although relatively safe, is not without impact on the offspring. Literature also reports adverse effects on offspring, including fetal bradycardia, apnea, and seizures associated with pudendal nerve anesthesia in pregnant individuals [25]. Furthermore, a comparative study between lidocaine and synthetic analog, investigating the frequency of micronuclei, found no genotoxic potential in mice treated with lidocaine via oral administration [26].

5. CONCLUSION

The assessment of anesthetic protocols in cesarean sections holds paramount importance for ensuring the well-being of both mothers and offspring. This study innovatively adapted and implemented the peripheral blood micronucleus assay technique - a powerful tool for detecting cytotoxicity and genotoxicity- in female dogs and their neonates. The successful adaptation of this technique to the canine species marks a significant stride in perinatal research, offering an alternative methodology to evaluate toxicity in companion animals.

The results obtained underscore the critical consideration of exposure time and administered doses, pivotal factors in determining the safety of anesthetics employed during cesarean sections. A detailed analysis of these findings underscores the imperative for more comprehensive and in-depth reviews, coupled with additional investigations. Such endeavors are essential to comprehend the long-term impacts and establish safer anesthetic protocols for obstetrical procedures in female dogs.

6. REFERENCES

1. MOON, P. et al. Perioperative risk factors for puppies delivered by cesarean section in the United States and Canada. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 36, n. 4, p. 359–368, 2000.
2. STEAGALL, P. V. et al. Perceptions and opinions of Canadian pet owners about anaesthesia, pain and surgery in small animals. *Journal of Small Animal Practice*, v. 58, n. 7, p. 380–388, 2017.

3. TUCKLEY, J. M. Pharmacology of local anaesthetic agents. Update in Anaesthesia, v. 4, p. 19-24, 1994.
4. TORRES, M.L.A. Toxicidade dos Anestésicos Locais: O Debate Continua. Revista Brasileira de Anestesiologia. v.56, n.4, p.339-342, 2006.
5. FARIAS, A. Anestesia em pacientes gestantes. In: APPARÍCIO, M.; VICENTE, W.R.R. (Eds.). Reprodução e Obstetrícia Veterinária em Cães e Gatos. São Paulo: MedVet, 2015. p. 247-256.
6. WAGNER, E.D., PLEWA, M. J. CHO cell cytotoxicity and genotoxicity analyses of disinfection by-products: an updated review. Journal of Environmental Sciences, v. 58, p.64-76, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.04.021>
7. KRISHNA, G. & HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. Mutation Research, v. 455, p. 155-166, 2000.
8. SOMMER, S., BURACZEWSKA, I., & KRUSZEWSKI, M. Micronucleus assay: the state of art, and future directions. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21041534>
9. GROPPETTI, D.; PECILE, A.; DEL CARRO, A.P.; COPLEY, K.; MINERO, M.; CREMONESI, F. Evaluation of newborn canine viability by means of umbilical vein lactate measurement, Apgar score and uterine tocodynamometry. Theriogenology. v. 74, p. 1187-1196, 2010.
10. OECD. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. 2016 Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
11. VON LEDEBUR, M.; SCHMID, W. The micronucleus test: Methodological aspects. Mutat. Res. v. 19, p.109–117, 1973.
12. MACGREGOR, J. T.; WEHR, C. M.; GOULD, D. H. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. Environ Mutag, v. 2, p. 509-514, 1980
13. Udriou, I., Ieradi, L. A., Cristaldi, M., & Tanzarella, C. Detection of clastogenic and aneugenic damage in newborn rats. Environmental and Molecular Mutagenesis, v.47, p. 320-324, 2006. <https://doi.org/10.1002/em.20209>

14. MATHEWS, K. Pain management for the pregnant, lactating, and neonatal to pediatric cat and dog. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 38, n. 6, p. 1291–1308, 2008.
15. WIEBE, V. J.; HOWARD, J. P. Pharmacologic advances in canine and feline reproduction. *Topics in Companion Animal Medicine*, v. 24, n. 2, p. 71–99, 2009.
16. Heddle, J. A., Fenech, M., Hayashi, M., & MacGregor, J. T. Reflections on the development of micronucleus assays. *Mutagenesis*, v. 26, p. 3–10, 2011. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq085>
17. FURTADO, M. A. et al. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutation Res*, v. 657, p. 150–154, 2008.
18. CHAPHEKAR, N. et al. Maternal-Fetal Pharmacology of Drugs: A Review of Current Status of the Application of Physiologically Based Pharmacokinetic Models. *Frontiers in Pediatrics*, v. 9, 2021.
19. ROBERTSON, S. Anaesthetic management for caesarean sections in dogs and cats. *In Practice*, v. 38, p. 327-339, 2016.
20. GAYNOR, J. S.; MUIR III, W. W. *Handbook of Veterinary Pain Management*, 2nd Edition. Mosby Elsevier, 2009.
21. Sung, C. M., Hah, Y. S., Kim, J. S., Nam, J. B., Kim, R. J., Lee, S. J., & Park, H. B. (2014). Cytotoxic effects of ropivacaine, bupivacaine, and lidocaine on rotator cuff tenofibroblasts. *The American journal of sports medicine*, v. 42, p. 2888–2896. <https://doi.org/10.1177/0363546514550991>
22. Wu, T., Shi, Z., Song, H., Li, Y., & Li, J. H. Cytotoxicity of local anesthetics on rabbit adipose-derived mesenchymal stem cells during early chondrogenic differentiation. *Experimental and therapeutic medicine*, v. 16, p. 2843–2850, 2028. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6539>
23. Grosskreutz, C. L., Katowitz, W. R., Freeman, E. E., & Dreyer, E. B. Lidocaine toxicity to rat retinal ganglion cells. *Current eye research*, v. 18, p. 363–367, 1999. <https://doi.org/10.1076/ceyr.18.5.363.5349>
24. Petrie, R. H., Paul, W. L., Miller, F. C., Arce, J. J., Paul, R. H., Nakamura, R. M., & Hon, E. H. Placental transfer of lidocaine following paracervical block. *American journal of obstetrics and gynecology*, v. 120, p.791–801, 1974. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(74\)90583-3](https://doi.org/10.1016/0002-9378(74)90583-3)

25. Bozynski, M. E., Rubarth, L. B., & Patel, J. Lidocaine toxicity after maternal pudendal anesthesia in a term infant with fetal distress. *American journal of perinatology*, v. 4, p.164–166, 1987. <https://doi.org/10.1055/s-2007-999764>
26. Déciga-Campos, M., Navarrete-Vázquez, G., López-Muñoz, F., Librowski, T., Sánchez-Recillas, A., Yáñez-Pérez, V., ... & Ortiz-Andrade, R. Complementary pharmacological and toxicological characterization data on the pharmacological profile of n-(2,6-dichlorophenyl)-2-(4-methyl-1-piperidinyl) acetamide. data in Brief, v. 8, p. 1007-1012, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.07.019>

ANNEX 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: “Avaliação da toxicidade de dois protocolos anestésicos aplicados a cadelas submetidas a cesariana eletiva”

Nome da Pesquisadora Responsável/Professora Responsável: M.V. Renatha Almeida de Araújo / Profa. Dra. Maricy Apparício Ferreira

Nome dos demais participantes da equipe:

M.V. Daniella Armani Jorge Coutinho / M.V. Samara Beretta / M.V. Anelise Santi Milaré/ João Domingos Rocha Júnior / Jaqueline Tamara Bonavina / Melissa de Oliveira Bianchini

1. **Natureza da pesquisa:** O Sr(Sra.) está sendo convidado(a) a autorizar a participação de seus animais nesta pesquisa que tem como finalidade avaliar e comparar, por meio de exames laboratoriais, 2 protocolos anestésicos diferentes em relação à segurança para gestante e seus filhotes.
2. **Identificação dos animais:** Serão utilizadas 24 cadelas gestantes e os filhotes provenientes de suas ninhadas.
3. **Envolvimento na pesquisa/aula:** ao participar deste estudo o(a) Sr.(a) permitirá que os pesquisadores e a Professora responsáveis realizem o acompanhamento pré-natal de sua cadela gestante (_____RGHV_____), comprometendo-se a apresentá-la ao Serviço de Obstetrícia e Reprodução Animal (SORA) do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da FCAV Unesp- Jaboticabal nas datas estabelecidas pela equipe de pesquisa.
4. **Sobre os dados necessários:** Serão realizados exames físicos (frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal e coloração de mucosas), laboratoriais (hemograma, ALT, creatinina), e avaliação ultrassonográfica. Os animais selecionados para comporem os grupos experimentais serão acompanhados no trabalho de parto normal, ou serão encaminhados para cesariana a ser realizada pela equipe de pesquisa nas dependências do setor. Na ocasião, serão coletadas amostras de sangue periférico da cadela (ponta de orelha) e sangue venoso por punção jugular. As cadelas serão submetidas a um dos protocolos anestésicos pré-determinados e sorteados aleatoriamente. Durante o parto serão coletadas amostras de líquido amniótico e de sangue do cordão umbilical de cada um dos filhotes. Os filhotes serão assistidos pela equipe e avaliados a partir da escala de Apgar modificada para a veterinária. Logo após o nascimento serão coletadas amostras de sangue periférico dos filhotes (coxim plantar). Após 48h do nascimento, serão coletadas novas amostras de sangue periférico da mãe e de cada um dos filhotes.
5. **Riscos e desconforto:** a participação nesta pesquisa não deverá ocasionar quaisquer desconfortos aos animais, além daqueles inerentes aos procedimentos adotados, que obedecem aos princípios éticos no uso de animais, elaborados pelo

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sobre a utilização de animais em atividades educacionais e em experimentos que envolvam espécies definidas na Lei 11.794/2008, tendo este projeto sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo: 011302/19.

6. **Confidencialidade:** todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente a professora e os pesquisadores responsáveis terão conhecimento dos dados.
7. **Benefícios:** Esperamos que este estudo traga dados importantes sobre a segurança de fármacos utilizados em cadelas submetidas a protocolos anestésicos para cesariana, bem como o impacto destes protocolos para os filhotes no pós-parto. Os pesquisadores e a professora se comprometem a divulgar os resultados obtidos.
8. **Pagamento:** Serão isentos os custos de consultas e exames ultrassonográficos, bem como a taxa cirúrgica (em caso de encaminhamento a cesariana), ficando a cargo do proprietário o custeio apenas do material utilizado e dos exames laboratoriais realizados.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para a participação de seu(s) animal(is) nesta pesquisa/aula. Preencher, por favor, os itens que se seguem:

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu

_____, RG: _____, CPF: _____, abaixo assinado, autorizo a participação de minha cadela gestante _____, RGHV _____, da raça _____, bem como dos filhotes provenientes desta gestação nesta pesquisa. Fui devidamente esclarecido pela pesquisadora Renatha Almeida de Araújo sobre os procedimentos envolvidos na pesquisa, assim como dos possíveis riscos e benefícios decorrentes da mesma. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento.

Jaboticabal, ____ de _____ de 20__

Assinatura do tutor

M.V. Renatha Almeida de Araújo

Profa. Dra. Maricy Apparício Ferreira

Comparative evaluation of amniotic cortisol concentration in elective and therapeutic cesarean sections

Renatha Almeida de Araújo¹, João Domingos Rocha Junior¹, Eunice Oba² and Maricy Apparício^{2*}

¹ Department of Pathology Reproduction and One Health, School of Agricultural and Veterinary Studies, São Paulo State University, FCAV/UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo D. Castellane s/n., Jaboticabal 14884-900, SP, Brazil; j.rocha@unesp.br (J.D.R.J.)

² Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Rua Professor Doutor Walter Mauricio Correa, s/n., Botucatu 18618-681, SP, Brazil; maricy.apparicio@unesp.br (M.A.)

* Correspondence author: maricy.apparicio@unesp.br

Abstract: Thirty female dogs, aged between 1 and 5 years and varying in weight, in the final third of gestation, were evaluated. The animals were divided into two groups: the first group (GC) comprised 22 bitches undergoing elective cesarean section, while the second group (GD) consisted of 8 dogs attended due to dystocia, undergoing therapeutic cesarean section. Anesthetic induction for both groups involved 3mg/kg of propofol for orotracheal intubation, maintained with isoflurane vaporization. Additionally, a regional blockade using 2% lidocaine at 2 mg/kg was performed epidurally. Offspring born through elective cesareans showed significantly higher cortisol levels compared to those born through therapeutic cesareans. No correlation was found between meconium presence in amniotic fluid and cortisol levels, nor between neonatal distress and cortisol levels or meconium presence. Offspring weight was directly correlated with fetal cortisol levels. No significant differences in cortisol levels were observed among fetuses with the same birth order but different types of delivery. Furthermore, there was no correlation between the type of delivery and cortisol or progesterone levels in maternal blood. This study contributes to a better understanding of the relationships between delivery type, hormone levels, and neonatal viability in female dogs.

Key words: Apgar score; Cortisol; Dystocia; Elective c-section; Progesterone

1. Introduction

Birth is the event that marks the end of gestation, in which the female gives birth to her offspring. It involves a series of neuroendocrine adaptations and modifications of the reproductive system to facilitate the expulsion of fetuses, placentas, and other fetal attachments (Voorwald and Tiosso, 2015).

The adequate understanding of the events taking place during physiological childbirth is essential for etiological identification and decision-making regarding the treatment to be established for potential childbirth pathologies (Gendler et al., 2007). Dystocias are common emergencies in veterinary medical practice and are responsible for an increased risk of maternal and fetal death (Cornelius et al., 2019). The causes of dystocia may be related to problems with the puppies and/or the pregnant female.

Monitoring the pregnant dog is critical for the success of cesareans. The ideal timing of delivery is hindered by the variation in the duration of gestation in dogs. Using the mating date as a sole parameter for estimating the probable delivery date is a poor tool. It requires the association of multiple investigative methods to plan delivery more accurately (Verstegen-Onclin and Verstegen, 2008) since, due to the short gestation period, intervals of a few days make a huge difference in fetal maturity, with implications for neonatal morbidity and mortality rates. Therefore, assessing the exact timing of cesarean intervention is crucial to ensure that the fetuses reach, but do not exceed, the appropriate gestational age (Lopate, 2008).

At the end of gestation, the increased production of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) leads to an increase in fetal cortisol production. Cortisol, in turn, causes progesterone to be converted into estrogen, leading to a significant decline in its plasma concentration, dropping from 4 to 10 ng/mL during gestation to <2 ng/mL before birth (Veronesi et al., 2002).

The role of cortisol in signaling birth in dogs is a complex process involving the regulation of various physiological mechanisms. Studies demonstrate a significant increase in cortisol levels at the time of birth, which remained elevated 12 hours after the onset of birth, subsequently decreasing within 36 hours after the onset of pup delivery (Veronesi et al., 2002). The increase in plasma cortisol during labor in female dogs highlights its importance in birth signaling and the physiological mechanisms involved in delivery (Olsson et al., 2003).

To enhance accuracy in predicting the delivery date and optimize decision-making regarding the timing of elective cesareans, this study aimed to determine serum cortisol levels in maternal blood and establish an association between these

levels and cortisol present in amniotic fluid, with the aim of assessing fetal maturity and stress in pups. The study sought to produce data assisting the veterinary professional in decision-making, reducing risks for the pregnant female and preventing neonatal prematurity. Additionally, the research aimed to correlate Apgar scores with cortisol levels in amniotic fluid to identify pups that may require intensive care.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics in the Use of Animals

The project received approval from the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Faculty of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine (FCAV) – UNESP, Jaboticabal Campus (Protocol 011302/19).

2.2. Animals

Thirty female dogs, aged between two and five years with varying weights, in the final third of gestation were used. Among these, 22 underwent elective cesarean section (GC) - 16 English Bulldogs, 4 French Bulldogs, and 2 Chow Chows (total number of pups = 94) - while 7 animals presented dystocic labor (GD) - 1 Shih-Tzu, 1 English Bulldog, 3 American Bullies, 1 Border Collie, and 1 mixed breed (total number of pups= 20).

The female dogs in the elective cesarean group (GC) were monitored by the Animal Obstetrics and Reproduction Service (SORA) of the Veterinary Hospital Governor Laudo Natel of FCAV Unesp - Jaboticabal. Gestational timing determination considered the mating date (58 to 63 days), fetal maturation variables from ultrasonographic examination, as described by Luvoni and Beccaglia (2006) and radiography. The appropriate time for cesarean section was established based on these evaluations and the observation of rectal temperature drop (0.5 to 1°C), monitored every six hours from the 56th day post-mating/insemination, with delivery estimated around 24 hours after measuring 37.5°C, and the determination of serum progesterone concentration as recommended (Smith, 2007).

2.3. Selection Criteria

Pregnant dogs showing signs of dystocia were diagnosed regarding the maternal or fetal origin of the pathology, with only dogs showing maternal origin dystocias included in GD. The onset time of labor was also a limiting factor; therefore, only dystocias with a maximum of 6 hours of progression from the second stage of labor were included in the study.

Dystocic deliveries were classified as those presenting one or more of the following characteristics: absence of abdominal contractions, over 30 minutes of vigorous contraction without fetal expulsion, clear signs of the expulsion phase for more than two hours without fetal presentation, evident maternal distress, rupture of fetal membranes without fetal expulsion, presence of greenish secretion without fetal expulsion, and fetal distress (heartbeats equal to or less than 150 bpm).

2.4 Surgical Procedure and Neonatal Management

Before the surgical procedure, all owners signed an informed consent form (ICF), being informed about the study procedures and the use of results for scientific dissemination. The female dogs underwent clinical and laboratory examinations (complete blood test, serum creatinine and ALT) to determine their health status and ensure the safety of subsequent procedures.

Regardless of elective or therapeutic surgery, anesthetic induction was performed using propofol at a dose of 2 mg/kg for orotracheal intubation, and maintenance was carried out using isoflurane vaporization. Additionally, regional blockade with 2% lidocaine at a dose of 2 mg/kg was performed via epidural route.

Neonatal care was provided by a trained team. Resuscitation involved airway cleaning and obstruction relief, stimulation of breathing through chest friction with compresses, and careful drying to avoid hypothermia. Neonatal vitality was assessed using the modified Apgar score proposed by Groppetti et al. (2010) at moments E0 (immediately after cardiopulmonary resuscitation) and E5 (5 minutes after). All puppies were assessed for possible congenital abnormalities, and their gender and weight were determined.

2.5. Sample Collection

Amniotic fluid collection was performed by puncture of the amniotic sac before rupture. For each sample, 2 mL were stored in Eppendorf tubes at -20°C, and the remainder was centrifuged at 2500g for 10 minutes; the supernatant was aliquoted and stored similarly. Samples containing meconium or originating from neonates with any type of anomaly or malformation were identified for later correlation with measured cortisol values.

Maternal blood samples were collected via jugular venipuncture immediately before the surgical procedure. The samples were centrifuged at 2500g for 10 minutes, and the serum was aliquoted and stored in Eppendorf tubes at -20°C.

2.6. Analysis of Fetal Fluids and Maternal Blood

Amniotic fluid samples collected and the blood samples collected immediately before the surgical procedure underwent cortisol assay using the Beckman Coulter© Cortisol RIA Kit for radioimmunoassay (RIA). The samples were sent to the Endocrinology Laboratory of the School of Veterinary Medicine - FMVZ, Unesp, Botucatu - SP, where cortisol levels were determined using the Perkin Elmer 1470 automatic device, employing the mentioned commercial solid-phase kit according to the manufacturer's recommendations.

Maternal blood samples collected immediately after cesarean section underwent progesterone assay using the chemiluminescence method.

2.7. Statistical Analysis

The statistical analysis was conducted using SigmaPlot software, version 14.0. All tests were performed at a 5% level of significance.

Data were tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test. The comparison between fetal cortisol levels regarding the type of delivery, presence or absence of meconium in fetuses, was tested using the non-parametric Mann-Whitney test. This test was also employed to compare the type of delivery and neonatal viability obtained from the Apgar score; neonatal viability and the presence of meconium in samples; and the type of delivery and maternal blood cortisol level collected immediately before the surgical procedure. The correlation between the Apgar

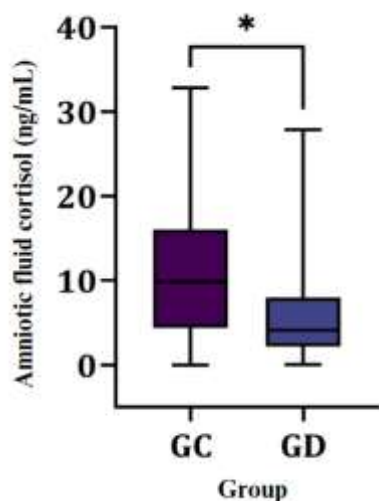
score/birth order of neonates and fetal cortisol levels was tested using the Spearman test. Lastly, the comparison between the type of delivery and the concentration of progesterone in maternal blood collected immediately after the surgical procedure was tested using the Student's t-test.

3. Results

3.1. Amniotic Cortisol and Type of Delivery

The cortisol levels in pups born through elective cesarean section (n=94) showed higher levels ($p=0.017$) compared to those from dogs undergoing therapeutic cesarean section (n=20), as shown in figure 1.

Figure 1. Comparison between cortisol concentrations in amniotic fluid of fetuses born through elective cesarean section (group GC) in relation to those born through therapeutic cesarean section (group GD). The boxes represent the lower and upper quartiles; the lines inside the boxes represent the respective medians. * indicates significant difference in the comparison between groups.

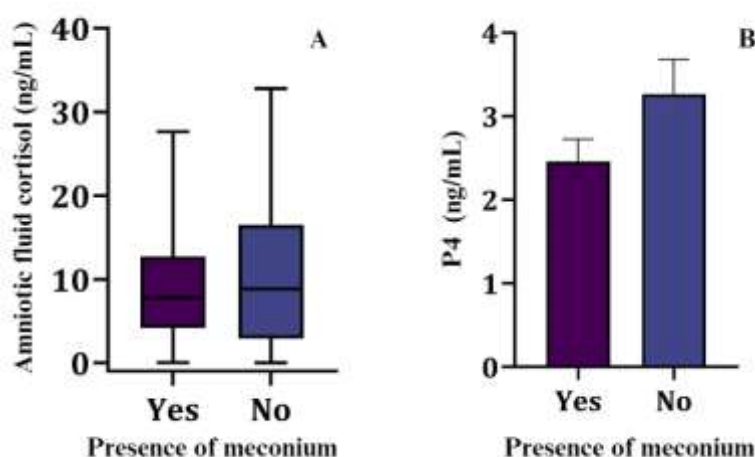


The median concentrations found were 9.86 ng/mL for group GC and 4.11 ng/mL for group GD. There was no significant correlation between the birth order of neonates and the obtained amniotic cortisol levels ($p>0.05$).

3.2. Meconium

The presence of meconium in the amniotic fluid showed no relation to amniotic cortisol nor P4 values ($p>0.05$) as shown in figure 2, regardless of the parturient condition. Most samples of amniotic fluid containing meconium were from elective cesarean sections (87.5%); however, there was no significant association between the type of delivery and the presence of meconium in amniotic fluid ($p>0.05$).

Figure 2. Representation of the relationship between the concentration of amniotic cortisol (A) and plasma P4 levels (B) and the presence of meconium in the amniotic fluid. The boxes represent the lower and upper quartiles; the lines inside the boxes represent the respective medians.



3.3. Neonatal Viability

Table 1 presents the results regarding neonatal viability. Forty-four individuals were assessed for neonatal viability according to the Apgar scale. At moment E0 (immediately after cardiopulmonary resuscitation), most neonates born through elective cesarean section (92.86%) showed no distress, while at the same moment, the majority of neonates born through therapeutic cesarean section (56.25%) showed moderate distress. Regarding moment E15 (15 minutes after cardiopulmonary resuscitation), the same situation was observed (89.29% of group GC neonates and 56.25% of group GD neonates).

Experimental Group	Severe distress (0 - 4)	Moderate distress (5 - 9)	Absence of distress (10 - 13)
Immediately after CPR*			
GC	1 (3.6)	1 (3.6) ^a	26 (92.9) ^a
GD	0 (0)	9 (56.3) ^b	7 (43.8) ^b
5 minutes after CPR			
GC	0 (0)	3 (10.7) ^a	25 (89.3) ^a
GD	0 (0)	9 (56.3) ^b	7 (43.8) ^b

Table 1. Distribution of the number (and percentage) of neonates born through elective cesarean section (GC) and therapeutic cesarean section (GD), according to the degree of distress obtained from the Apgar scale at the two moments evaluated in this study. *Cardiopulmonary resuscitation. Different lower-case letters (a or b) in the same column represent statistical differences in the comparison of means ($p > 0.05$).

A highly significant correlation ($p \leq 0.001$) was observed between the type of delivery and the level of neonatal distress at the two evaluated moments. Neonates born through therapeutic cesarean section exhibited higher levels of distress. No association was identified between the degree of distress and cortisol levels in the amniotic fluid ($p > 0.05$), nor between neonatal distress and the presence of meconium in the amniotic fluid ($p > 0.05$).

3.4. Birth Order and Litter Size

No significant differences ($p > 0.05$) were observed in cortisol concentrations among fetuses with the same birth order but from different types of delivery, and there was no correlation between litter size and cortisol levels, both fetal and maternal ($p > 0.05$).

3.5. Maternal Blood

There was no correlation between the type of delivery and cortisol levels in maternal blood collected immediately before the surgical procedure ($p>0.05$). In both groups, the mean remained close to 20 ng/mL. Similarly, there was no association between levels of progesterone in maternal blood, collected immediately after the surgical procedure, with the type of delivery or the presence of fetuses with meconium in the amniotic cavity ($p>0.05$). The mean progesterone level in the elective cesarean group was just below 3 ng/mL, while in the therapeutic cesarean group, it exceeded 3 ng/mL.

4. Discussion

Elevated cortisol concentration is also crucial for surfactant production, substances responsible for lung maturation and aiding neonatal respiration (McDonald et al., 1989; Feldman and Nelson, 1996). Throughout gestation, maternal cortisol concentrations remain within normal parameters (1.5-2.5 $\mu\text{g/dL}$); in the last week, they rise to 4.0-8.0 $\mu\text{g/dL}$, declining to 1.0-2.5 $\mu\text{g/dL}$ during labor (Rodrigues et al., 2009).

Regarding fetal cortisol, it is known to increase by about 50% after 35 weeks of gestation in humans, with its concentration quadrupling during labor, remaining elevated for several hours after birth (Abreu, 2018). In a study (Bolis et al., 2017), an average of 3.7 ng/mL of cortisol was found in the amniotic fluid of canine fetuses born from elective cesarean sections, originating from purebred dogs at high risk of dystocia (Pug, Chihuahua, Bull Terrier, German Spitz, Maltese, and Dachshund). Additionally, the same study found a higher cortisol concentration in the amniotic fluid of pups deceased 24 hours after birth compared to those alive at 24 hours post-birth. Similar cortisol averages were found in puppies born from elective cesarean sections (3.83 ± 0.44 ng/mL), while the average in those born from therapeutic cesarean sections for dystocia resolution was 14.01 ± 1.10 ng/mL (Plavec et al., 2022).

The results of this study indicate that cortisol levels in amniotic fluid were significantly higher in fetuses born through elective cesarean section compared to those born through therapeutic cesarean section. These findings differ from studies (Bolis et

al., 2017; Plavec et al., 2022), and this discrepancy could be attributed to the variation in the sample size of the studied groups. In pathological delivery situations, increased fetal cortisol levels due to fetal distress are generally expected. In women, serum cortisol levels also tend to be higher in cases of emergency cesarean sections than in elective ones due to maternal anxiety inherent in the dystocic condition (Nurdin et al., 2022). Higher cortisol concentrations have also been observed in women during vaginal delivery compared to those undergoing elective cesarean sections (Stjernholm et al., 2016).

In human medicine, it is common for pregnant women to undergo amniocentesis to evaluate fetal well-being and maturation during pregnancy by measuring cortisol levels, among other substances. However, this method is not commonly used in canines (Groppetti et al., 2015). One of the major limitations of this technique is the anatomical disposition of the amniotic vesicle during gestation, which complicates a more precise approach (Christiansen, 1988). Therefore, hormonal measurement of amniotic and allantoic fluids can only be performed after the birth of the puppies. Collecting fetal fluids at birth is safe for the puppies and does not interfere with neonatal health, proving extremely useful for various analyses (Dall'Ara et al., 2015; Meloni et al., 2014). The increase in maternal cortisol release during the perinatal period can interfere with puppy development and labor. Cortisol measurement is a highly useful tool as a marker of maternal stress, with plasma being the most sensitive substrate for evaluation (Groppetti et al., 2021).

In women, the presence of meconium in the amniotic fluid is considered indicative of fetal hypoxia distress, associated with increased rates of emergency cesarean section, need for neonatal resuscitation, alterations in cardiotocography exams, and lower Apgar scores in neonates (Vaghela et al., 2014; Mohan and Deepak, 2018). However, the presence of meconium can also be observed in uncomplicated deliveries, with neonates showing adequate vitality, depending on the quantity and viscosity of the meconium found (Batista et al., 2014). The absence of a significant relationship between the presence of meconium and fetal cortisol values in this study suggests a stronger association with the maturation process rather than the degree of fetal distress. The lack of association between the type of delivery and the degree of

neonatal distress in the presence of meconium also support this hypothesis. It is important to note that the association between the presence of meconium in the amniotic fluid and adverse neonatal outcomes may be influenced by other factors, and careful evaluation and monitoring in cases of meconium in the amniotic fluid are essential to determine the precise impact of this condition (Vaghela et al., 2014).

In the present study, approximately 56.25% of fetuses born from therapeutic cesarean sections showed Apgar scores indicative of moderate distress, while 92.86% of fetuses born from elective cesarean sections showed no distress. Moreover, the highly significant correlation between the type of delivery and the degree of neonatal distress, with more severe levels in fetuses born from therapeutic cesarean sections, indicates that these fetuses are indeed at a higher risk of survival compared to those born from elective cesarean sections. These data corroborate previous research that demonstrated a direct relationship ($p < 0.01$) between Apgar scores and neonatal viability in brachycephalic breeds (Batista et al., 2014). This finding is of utmost importance, especially when discussing breeds with a high probability of experiencing dystocia, which has been proven to increase neonatal mortality rates.

Studies have shown that both large and very small litters are associated with reduced puppy survival at birth (Bennett, 1974; Darvelid and Linde-Forsberg, 1994). A study with brachycephalic dogs showed higher neonatal viability in puppies born in larger litters compared to those born in smaller ones (Adams et al., 2022). In this study, no correlation was observed between litter size and cortisol levels, both fetal and maternal.

The success of cesarean section crucially depends on the timing of the procedure, both in elective approaches and therapeutic cesarean sections. In breeds and individuals with a predisposition or history of dystocia, elective cesarean sections tend to have a more favorable outcome for both the mother and the puppies, with emergency cesarean sections associated with a higher risk of stillbirths (De Cramer and Nöthling, 2020). Determining the ideal moment for intervention requires meticulous monitoring and recording of variables indicative of fetal maturity and labor signaling, such as maternal rectal temperature changes and hormonal fluctuations (Smith, 2007).

Some authors suggest that elective cesarean sections should be performed after the decline in progesterone levels to less than 2 ng/mL (Sophia et al., 2021). In this study, the observed progesterone concentrations did not reach the values described in the literature, and despite the significantly higher level of fetal distress in neonates born from emergency cesarean sections, there was no negative correlation with progesterone levels in either group.

5. Conclusion

The results of this study demonstrate an association between elevated levels of amniotic cortisol in elective cesarean sections and improved neonatal viability indices, reflected in the lower incidence of disturbances immediately following cardiopulmonary resuscitation. Furthermore, the presence of meconium in the amniotic cavity showed no correlation with cortisol or progesterone levels, suggesting that this variable does not directly influence neonatal physiological response. The stability of maternal cortisol and progesterone levels concerning the type of delivery reinforces the utility of these variables as physiological markers.

These findings underscore the importance of considering amniotic cortisol levels as a potential indicator of neonatal physiological response and the effectiveness of neonatal care. The data from this study highlight the relevance of the measured variables as important tools for evaluating and guiding clinical approach in neonates, providing more precise information to veterinary professionals in decision-making regarding patient management. It is important to emphasize that cesarean section should never be regarded as a convenient surgical intervention, and the breeding of breeds incapable of natural delivery should not be encouraged (Ross et al., 2023; Schrank et al., 2022).

6. References

Abreu, R.A. (2018). Desempenho respiratório na transição feto-neonatal de cães nascidos em eutocia vaginal ou cesariana eletiva. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Adams, D.J., Ellerbrock, R.E., Wallace, M.L., Schmiedt, C.W., Sutherland, B.J., & Grimes, J.A. (2022). Risk factors for neonatal mortality prior to hospital discharge in brachycephalic and nonbrachycephalic dogs undergoing cesarean section. *Veterinary Surgery*, 51(7), 1052-1060. <https://doi.org/10.1111/vsu.13868>.

Batista, M., Moreno, C.A.C., Vilar, J.M.G., Golding, M.C., Brito, C.A.d., Santana, M., & Alamo, D. (2014). Neonatal viability evaluation by Apgar score in puppies delivered by cesarean section in two brachycephalic breeds (English and French bulldog). *Animal Reproduction Science*, 146(3-4), 218-226. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.03.003>.

Bennett, D. (1974). Canine dystocia—a review of the literature. *Journal of Small Animal Practice*, 15, 101–117.

Bolis, B., Prandi, A., Rota, A., Faustini, M., & Veronesi, M.C. (2017). Cortisol fetal fluid concentrations in term pregnancy of small-sized purebred dogs and its preliminary relation to first 24 hours survival of newborns. *Theriogenology*, 88, 264-269.

Christiansen, I.B.J. (1988). Reprodução no cão e gato. Editora Manole.

Cornelius, A.J., Moxon, R., Russenberger, J., Havlena, B., & Cheong, S.H. (2019). Identifying risk factors for canine dystocia and stillbirths. *Theriogenology*. Aceito para publicação.

Dall'Ara, P., Meloni, T., Rota, A., Servida, F., Filipe, J., & Veronesi, M.C. (2015). Immunoglobulins G and lysozyme concentrations in canine fetal fluids at term of pregnancy. *Theriogenology*, 83, 766-771.

Darvelid, A.W., & Linde-Forsberg, C. (1994). Dystocia in the bitch: a retrospective study of 182 cases. *Journal of Small Animal Practice*, 35, 402-407.

De Cramer, K., & Nöthling, J. (2020). Towards scheduled pre-parturient caesarean sections in bitches. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(S2), 38-48. <https://doi.org/10.1111/rda.13669>.

Feldman, E.D., & Nelson, R.W. (1996). *Canine and feline endocrinology and reproduction*, 2nd ed.

Gendler, A., Brouman, J.D., & Graf, K.E. (2007). Canine Dystocia: Medical and Surgical. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian-North American*, 29, 551-563.

Groppetti, D., Martino, P.A., Ravasio, G., Bronzo, V., & Pecile, A. (2015). Prognostic potencial of amniotic fluid analysis at birth on canine neonatal outcomes. *Vet J.*, 206(3), 423-425.

Groppetti, D., Meazzi, S., Filipe, J., Colombani, C., Panseri, S., Zanzani, S.A., & Pecile, A. (2021). Maternal and neonatal canine cortisol measurement in multiple matrices during the perinatal period: a pilot study. *Plos One*, 16(7), e0254842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254842>.

Groppetti, D., Pecile, A., Del Carro, A.P., Copley, K., Minero, M., & Cremonesi, F. (2010). Evaluation of newborn canine viability by means of umbilical vein lactate measurement, Apgar score and uterine tocodynamometry. *Theriogenology*, 74, 1187-1196.

Lopate, C. (2008). Estimation of gestational age and assessment of canine fetal maturation using radiology and ultrasonography: a review. *Theriogenology*, 70(3), 397-402. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.034>

Luvoni, G.C., & Beccaglia, M. (2006). The prediction of parturition date in canine pregnancy. *Reprod. Dom. Anim.*, 41, 27-32.

Meloni, T., Comin, A., Rota, A., Peric, T., Contri, A., & Veronesi, M.C. (2014). IFG-I and NEFA concentrations in fetal fluids of term pregnancy dogs. *Theriogenology*, 81, 1307-1311.

McDonald, L.E., & Pineda, M.H. (1989). *Veterinary endocrinology and reproduction* (4th ed.). pp. 512-523.

Mohan, M., & Deepak, A.V. (2018). Maternal risk factors and perinatal outcome in meconium stained amniotic fluid: a cross sectional study. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*, 7(10), 4103. <https://doi.org/10.18203/2320-1770.ijrcog20184136>.

Nuridin, N.O.S., Wantania, J., & Mewengkang, R.A.A. (2022). Assosiation between serum cortisol levels and anxiety levels in elective and emergency cesarean section. *Indonesian Journal of Obstetrics and Gynecology*, 205-210. <https://doi.org/10.32771/inajog.v10i4.1624>.

Olsson, K., Bergström, A., Kindahl, H., & Lagerstedt, A. (2003). Increased plasma concentrations of vasopressin, oxytocin, cortisol and the prostaglandin f2 α metabolite during labour in the dog. *Acta Physiologica Scandinavica*, 179(3), 281-287. <https://doi.org/10.1046/j.0001-6772.2003.01178.x>.

Plavec, T., Knific, T., Slapsak, A., Raspor, S., Lukanc, B., & Pipan, M.Z. (2022). Canine neonatal assessment by vitality score, amniotic fluid, urine, and umbilical cord blood analysis of glucose, lactate and cortisol: possible influence of parturition type? *Animals*, 12, 1247.

Rodrigues, V., Toniollo, G.H., Lopes, P.R., Cardilli, D.J., & Oliveira, J.A. (2009). Teores séricos de cortisol de fêmeas caninas (*Canis familiaris* - Linnaeus, 1758) submetidas à cesariana. *Ciência Animal Brasileira*, 10(4), 1186-1190.

Ross, K., Langford, F.M., Pearce, D., & McMillan, K.M. (2023). What patterns in online classified puppy advertisements can tell us about the current UK puppy trade. *Animals*, 13(10), 1682. <https://doi.org/10.3390/ani13101682>.

Schrank, M., Contiero, B., & Mollo, A. (2022). Incidence and concomitant factors of cesarean sections in the bitch: a questionnaire study. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.934273>.

- Sophia, X., Jayakumar, C., Abhilash, R., Magnus, P., & Dhanush, K. (2021). Maternal and neonatal outcome following elective cesarean section based on progesterone levels in high risk pregnant dogs. *Indian Journal of Animal Research*. <https://doi.org/10.18805/ijar.b-4520>
- Smith, F.O. (2007). Challenges in small animal parturition—Timing elective and emergency cesarean sections. *Theriogenology*, 68(3), 348-353.
- Stjernholm, Y.V., Nyberg, A., Cardell, M., & Höybye, C. (2016). Circulating maternal cortisol levels during vaginal delivery and elective cesarean section. *Archives of gynecology and obstetrics*, 294(2), 267–271. <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3981-x>.
- Vaghela, H.P., Deliwala, K.J., & Shah, P.T. (2014). Fetal outcome in deliveries with meconium stained liquor. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*, 3(4), 909. <https://doi.org/10.5455/2320-1770.ijrcog20141207>.
- Veronesi, M., Battocchio, M., Marinelli, L., Faustini, M., Kindahl, H., & Cairoli, F. (2002). Correlations among body temperature, plasma progesterone, cortisol and prostaglandin f2 α of the periparturient bitch. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 49(5), 264-268. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2002.00410.x>.
- Verstegen-Onclin, K., & Verstegen, J. (2008). Endocrinology of pregnancy in the dog: a review. *Theriogenology*, 70(3), 291-299. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.038>.
- Voorwald, F.A., & Tiosso, C.F. (2015). Distocias. In: *Reprodução e Obstetrícia Veterinária em Cães e Gatos*; Apparício, M., Vicente, W.R.R., Eds.; MedVet: São Paulo, Brazil, pp. 203-217.