

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ELASTOGRAFIA *ACOUSTIC RADIATION FORCE IMPULSE*
(ARFI) DOS TECIDOS HEPÁTICO E ESPLÊNICO DE
PACIENTES CANINOS AFETADOS PELA SÍNDROME
BRAQUICEFÁLICA**

Andréia Coutinho Facin

Médica Veterinária

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ELASTOGRAFIA *ACOUSTIC RADIATION FORCE IMPULSE*
(ARFI) DOS TECIDOS HEPÁTICO E ESPLÊNICO DE
PACIENTES CANINOS AFETADOS PELA SÍNDROME
BRAQUICEFÁLICA**

Discente: Andréia Coutinho Facin

Orientadora: Profa. Dra. Paola Castro Moraes

Coorientador: Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho

Coorientador: Prof. Dr. Marcus Antônio Rossi Feliciano

Dissertação apresentada à banca examinadora da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

2020

F141e

Facin, Andréia Coutinho

Elastografia Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) dos tecidos hepático e esplênico de pacientes caninos afetados pela síndrome braquicefálica / Andréia Coutinho Facin. -- Jaboticabal, 2020
65 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Paola Castro Moraes

Coorientador: Aparecido Antonio Camacho

1. Apneia obstrutiva do sono. 2. Vias respiratórias Obstrução. 3.
Ultrassonografia Veterinária. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ELASTOGRAFIA ACOUSTIC RADIATION FORCE IMPULSE (ARFI) DOS TECIDOS HEPÁTICO E ESPLÊNICO DE PACIENTES CÂINOS AFETADOS PELA SÍNDROME BRAQUICEFÁLICA

AUTORA: ANDRÉIA COUTINHO FACIN

ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES

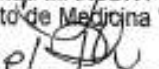
COORDENADOR: APARECIDO ANTONIO CAMACHO

COORDENADOR: MARCUS ANTÔNIO ROSSI FELICIANO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNESP / FCAV - Jaboticabal


Pós-doutoranda MARJURY CRISTINA MARONEZI (VIDEOCONFERÊNCIA)
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. LIANE ZILLOTTO (VIDEOCONFERÊNCIA)
Universidade Estadual do Centro-Oeste / Guarapuava/PR

Jaboticabal, 30 de julho de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Andréia Coutinho Facin, natural de Campinas – SP, nascida no dia 15 de março de 1992. Formada em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP Câmpus de Jaboticabal, graduação realizada entre 2011 – 2015. Concluiu três projetos de iniciação científica durante a graduação, com dois deles tendo enfoque em cirurgia de pequenos animais. Realizou residência multiprofissional em área da saúde - MEC/SUS com área de concentração em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP Câmpus de Jaboticabal, sob orientação da Prof. (a) Dr. (a) Paola Castro Moraes. Atualmente é aluna do curso de Mestrado do Programa de pós-graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP Câmpus de Jaboticabal, com orientação da Profa. Dra. Paola Castro Moraes e bolsista Fapesp. Realizou estágio de pesquisa no exterior (bolsa BEPE – Fapesp) com grupo de pesquisa da universidade de Cambridge – Inglaterra, sob orientação da Profa. Jane Ladlow e pesquisadora Nai-Chieh Liu. Atua junto ao Serviço de Cirurgia Geral e Endoscopia Veterinária (CIGEV).

EPÍGRAFE

“What is success? I think it is a mixture of having a flair for the thing that you are doing; knowing that it is not enough, that you have got to have hard work and a certain sense of purpose”.

- Margaret Thatcher

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus. Nos detalhes e nas grandezas vejo Seu amor. Tudo começou com um sonho, que evoluiu, cresceu e avançou fronteiras que antes eu sonhava e, então, se tornaram realidade. Seu amor me amparou e me levantou nos momentos difíceis que tive no caminho, Sua luz me guiou e hoje, com toda certeza, afirmo: Ele é Fiel, Ele me trouxe até aqui.

À minha família, todo meu amor. Ao meu pai, João, agradeço pelo incentivo a continuar na carreira acadêmica e a perseguir meus sonhos. A minha mãe, Ana, obrigada por todo apoio, obrigada por lutar e me incentivar sempre. Ao meu irmão Gabriel, obrigada por fazer parte da minha vida, me incentivar e ser o doce menino que você é, sou a irmã mais orgulhosa do mundo. Ao meu noivo, Olavo, obrigada por compartilhar comigo cada momento, sempre me incentivando a lutar por aquilo que acredito. E aos meus sogros, Carlos e Maria, obrigada por todas as orações e por serem um presente de Deus na minha vida.

Aos amigos mais próximos agradeço imensamente por cada momento vivido. À família CCPA, que criei durante a residência obrigada por toda parceria. Especialmente Mareliza e Gabriel, obrigada por compartilharem até os sofrimentos do mestrado comigo. Laura e Dani, vocês fizeram destes dois anos um tempo muito mais leve e sinto muita saudade. Às meninas que estão comigo desde a graduação, Bia, Lelê e Dani, o tempo a mais em Jaboticabal com toda certeza foi melhor por ter vocês comigo. À minha querida amiga Ana Clara, incentivadora oficial do mestrado, obrigada por toda amizade, sei que Deus colocou você para nunca mais sair do meu coração.

Agradeço também imensamente a todos os animais que encontrei nesse caminho. Especialmente aos braquis, obrigada por me ensinarem tanto. O que eu antes achava que sabia agora sei que nada sabia, e ainda tenho muito a saber. Devo a vocês todo meu aprendizado nesse caminho e continuarei lutando para que o bem-estar destes animais possa ser o objetivo de muitos. Aqueles que eu não consegui fazer melhor ou mais do que fiz, os levo comigo como lembrança e aprendizado de que nunca sabemos de tudo e sempre podemos melhorar.

Por fim, mas não por último, sou imensamente grata aos profissionais veterinários que tive a honra de trabalhar durante meu mestrado. À Marjory meu muito obrigada por sua colaboração e ensinamentos. Sinto um orgulho imenso de ter

trabalhado com você. À professora Paola, minha orientadora e mãe científica, espero que nosso caminho juntas não acabe por aqui. Obrigada por todo carinho e todos os incentivos, por acreditar em mim e por toda humildade em me dar a liberdade de realizar ousadias novas na cirurgia.

Com imenso prazer agradeço à toda equipe do grupo de pesquisa em síndrome braquicefálica da Universidade de Cambridge – UK. Obrigada Nai Chieh Liu, Jane Ladlow, Phil Franklin e Liane Ziliotto por me receberem e transmitirem tantos conhecimentos. Nai Chieh foi uma amiga que não esperava encontrar e espero que o meu caminho cruze com o de todos novamente. Por fim, agradeço meu coorientador Marcus pelas direções e Ricardo, que muito me ensinou sobre pesquisa ao longo deste projeto.

Agradeço o apoio e financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) /CAPES pela bolsa de mestrado (nº 2017/ 24809-4). Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estágio em pesquisa no exterior (BEPE- FAPESP- mestrado - nº 2019/ 07087-0). Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento inicial da discente com bolsa de mestrado (nº 130820/2018-0).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
3. OBJETIVOS	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	8
4.1. Aspectos Éticos	8
4.2. Desenho experimental	8
4.3. Protocolo experimental	9
4.3.1 Seleção dos pacientes	9
4.3.2 Avaliação do perfil hepático e hemograma	11
4.3.3 Exames ultrassonográficos	11
4.3.3.1 Elastografia qualitativa e quantitativa	12
4.3.4 Classificação da síndrome braquicefálica e estenose de narina	16
4.3.5 Análise estatística	18
5. RESULTADOS	20
5.1. Animais	20
5.2. Exames ultrassonográficos e hematológicos	21
5.2.1 Ultrassonografia em modo B	21
5.2.2 Elastografia ARFI	21
5.2.2.1 Elastografia ARFI qualitativa	21
5.2.2.2 Elastografia ARFI quantitativa e exames hematológicos.....	21
5.2.2.3 Análise de correlação	26
5.2.2.4 Análise dos componentes principais	27
6 DISCUSSÃO	29
7 CONCLUSÕES	37
8 REFERÊNCIAS	38
9 APÊNDICE A	49
10 APÊNDICE B	51
11 APÊNDICE C	52



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



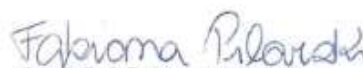
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

DECLARAÇÃO

Declaramos que o trabalho de pesquisa intitulado "**Elastografia ARFI dos tecidos hepático e esplênico de pacientes caninos afetados pela síndrome braquicefálica**", sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes e Certificado CEUA protocolo nº 017944/17, aprovado em reunião ordinária em 07 de dezembro de 2017, teve o número de animais alterado de 50 para 75 com aprovação "*ad referendum*" em 06 de novembro de 2018.

Vigência do Projeto	01/03/2018 a 01/03/2019
Espécie / Linhagem	<i>Canis lupus familiaris</i>
Nº de animais	75
Peso / Idade	Variáveis
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Pacientes atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV, UNESP, Jaboticabal.

Jaboticabal, 06 de novembro de 2018.


Prof.^a Dr.^a Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

ELASTOGRAFIA ACOUSTIC RADIATION FORCE IMPULSE (ARFI) DOS TECIDOS HEPÁTICO E ESPLÊNICO DE PACIENTES CANINOS AFETADOS PELA SÍNDROME BRAQUICEFÁLICA

RESUMO – O presente estudo teve como objetivo avaliar a rigidez tecidual de fígado e baço de cães braquicefálicos e sua correlação com a síndrome braquicefálica. A metodologia foi realizada com base em elastografia ARFI com utilização do aparelho ACUSON S2000/SIEMENS, com transdutores multifrequenciais convexo e linear, e softwares específicos. Foram selecionados 48 pacientes braquicefálicos e 22 controles mesocefálicos, com idade entre um a seis anos e faixa de peso delimitada. As raças braquicefálicas apresentaram rigidez hepática (lobos mediais: $1.52 \text{ m/s} \pm 0.36$; lobo esquerdo lateral: $1.47 \text{ m/s} \pm 0.47$; lobo direito lateral: $1.20 \text{ m/s} \pm 0.29$ e lobo caudado: $1.23 \text{ m/s} \pm 0.39$) e esplênica ($2.51 \text{ m/s} \pm 0.45$) significativamente maior do que cães mesocefálicos (*Fígado*: lobos mediais: $0.96 \text{ m/s} \pm 0.10$, lobo esquerdo lateral: $0.93 \text{ m/s} \pm 0.11$, lobo direito lateral: $0.74 \text{ m/s} \pm 0.08$, lobo caudado: $0.76 \text{ m/s} \pm 0.10$; *baço*: $2.29 \text{ m/s} \pm 0.34$) pela análise de variâncias ANOVA. Análise dos componentes principais fora realizada, na qual dois componentes (velocidades de cisalhamento do lobo esquerdo lateral, lobos mediais e lobo caudado versus hemoglobina, hematócrito, eritrócitos e ALT) explicaram 70% das variações obtidas entre os grupos. Cães braquicefálicos apresentaram maior rigidez de parênquima hepático e esplênico avaliado por elastografia ARFI quando comparados a cães mesocefálicos.

Palavras-chaves: apneia do sono, braquicefalia, cão, fibrose hepática, rigidez hepática

ACOUSTIC RADIATION FORCE IMPULSE (ARFI) ELASTOGRAPHY OF THE HEPATIC AND SPLENIC TISSUES OF CANINE PATIENTS AFFECTED BY BRACHYCEPHALIC SYNDROME

ABSTRACT - The present study aimed to evaluate the hepatic and spleen stiffness of brachycephalic dogs and its correlation with the brachycephalic syndrome. The tissue elasticity was evaluated by ARFI (Acoustic radiation force impulse) elastography, with convex and linear multifrequential transducers and specific software. Forty-eight brachycephalic and 22 mesocephalic dogs, with an age range between one to six years old and weight range also pre-define. The brachycephalic breeds showed values of liver stiffness (medial lobes: $1.52 \text{ m/s} \pm 0.36$; left lateral lobe: $1.47 \text{ m/s} \pm 0.47$; right lateral lobe: $1.20 \text{ m/s} \pm 0.29$ and caudate lobe: $1.23 \text{ m/s} \pm 0.39$) and spleen stiffness ($2.51 \text{ m/s} \pm 0.45$) significantly higher than the mesocephalic dogs (*Liver*: medial lobes: $0.96 \text{ m/s} \pm 0.10$, left lateral lobe: $0.93 \text{ m/s} \pm 0.11$, right lateral lobe: $0.74 \text{ m/s} \pm 0.08$, caudate lobe: $0.76 \text{ m/s} \pm 0.10$; *spleen*: $2.29 \text{ m/s} \pm 0.34$) by the analyses of variances ANOVA. A principal component analysis was performed in which two components (shear wave velocities of the left lateral, medial and caudate lobes versus hemoglobin, hematocrit erythrocytes and ALT) explained 70% of the variances between the groups. Brachycephalic dogs had higher spleen and liver stiffness when compared with mesocephalic dogs.

Keywords: brachycephaly, dogs, hepatic fibrosis, liver stiffness, sleep apnea

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Narinas abertas
ALT	Alanina aminotransferase
AOS	Apneia obstrutiva do sono
ARFI	<i>Acoustic Radiation Force Impulse</i>
AST	Aspartato aminotransferase
BD	Bilirrubina direta
BT	Bilirrubina total
DE	Narinas discretamente estenóticas
EC	Escore corporal
EN	Estenose de narina
LCd	Lobo hepático caudado
LEL	Lobo hepático esquerdo lateral
LDL	Lobo hepático direito lateral
LM	Lobos hepáticos mediais
ME	Narinas moderadamente estenóticas
Pm	Profundidade média
SE	Narinas severamente estenóticas
SB	Síndrome braquicefálica
SWV	<i>Shear wave velocity</i>
TTE	Teste de tolerância ao exercício

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1	Sistema de graduação funcional da síndrome braquicefálica (SB) baseada nos sinais respiratórios antes e após teste de tolerância a exercício (TTE).....
	17
Tabela 2	Resultados da análise de variâncias ANOVA dos valores de velocidade de cisalhamento obtidos (metros por segundo; média $\pm$ desvio padrão) por elastografia ARFI entre diferentes polos esplênicos e entre os lobos hepáticos laterais e mediais de cães braquicefálicos e mesocefálicos. Jaboticabal, 2019.....
	22
Tabela 3	Resultados da análise de variâncias ANOVA dos valores de velocidade de cisalhamento média obtidos por elastografia ARFI de tecido esplênico e lobos hepáticos, hemograma e bioquímica sérica (média $\pm$ desvio padrão) entre cães braquicefálicos e mesocefálicos. Jaboticabal, 2019.....
	23
Tabela 4	Resultados da análise de variâncias ANOVA dos valores de velocidade de cisalhamento média (média $\pm$ desvio padrão), obtidos por elastografia ARFI, de tecido esplênico e lobos hepáticos de cães braquicefálicos e mesocefálicos entre as diferentes raças, graus da síndrome braquicefálica, graus de estenose de narina e gênero. Jaboticabal, 2019.....
	25
Tabela 5	Valores para coeficiente de correlação (r) entre as medidas de velocidade da onda de cisalhamento e respectiva profundidade de medição, obtidas por meio de elastografia ARFI, entre os polos esplênicos e lobos hepáticos de cães braquicefálicos e mesocefálicos. Jaboticabal, 2019.....
	27
Tabela A1	Resultados da análise de variâncias ANOVA dos parâmetros obtidos por meio de hemograma e bioquímica sérica (média $\pm$ desvio padrão) comparados entre as raças estudadas e entre gêneros. Jaboticabal, 2019.....
	49
Tabela A2	Análise de variâncias ANOVA dos parâmetros de hemograma e bioquímica sérica (média $\pm$ desvio padrão) entre os graus de síndrome braquicefálica e graus de estenose de narina. Jaboticabal, 2019.....
	50

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Imagem ilustrativa de diagrama de fluxo exemplificando como o desenho experimental foi desenvolvido.....	10
Figura 2	Imagens de elastograma de paciente braquicefálico da raça buldogue francês classificado clinicamente como grau I da síndrome braquicefálica. A) Porção cranial de baço. B) Lobo hepático direito medial. Ambas imagens demonstram homogeneidade do parênquima em coloração de tonalidade cinza escuro.....	13
Figura 3	Imagens elastográficas de fígado de paciente braquicefálico da raça buldogue francês classificado clinicamente como grau I da síndrome braquicefálica. A) Lobo direito medial. B) Lobo esquerdo medial. C) Lobo esquerdo lateral. D) Lobo direito lateral. E) Lobo caudado.....	14
Figura 4	Imagens elastográficas de baço de paciente braquicefálico da raça buldogue francês classificado clinicamente como grau I da síndrome braquicefálica. A) Porção cranial de baço. B) Porção de corpo de baço. C) Porção caudal de baço.....	15
Figura 5	Fotografias do plano nasal de cães braquicefálicos para definição do grau de estenose de narina em buldogues franceses com diferentes graus segundo Liu et. al (2016). A) Narinas abertas, B) Narinas discretamente estenóticas C) Narinas moderadamente estenóticas D) Narinas severamente estenóticas.....	18
Figura 6	Imagem ilustrativa de diagrama de fluxo representando os passos seguidos para análise das variáveis obtidas no estudo....	19
Figura 7	Imagem ilustrativa da análise de correlação das variáveis qualitativas e quantitativas pelo método de Spearman.....	26
Figura 8	Gráfico de análise dos componentes principais de amostras de elastografia quantitativa de baço e fígado e análises hematológicas de hemograma e bioquímica sérica de cães braquicefálicos e mesocefálicos demonstra agrupamento das análises.....	28

1. INTRODUÇÃO

Um grande aumento na população de cães de raças braquicefálicas, como pugs, bulldogues ingleses e bulldogues franceses, tem sido observado nos últimos anos (The Kennel Club, 2019) e, neste cenário, o atendimento de indivíduos afetados pela síndrome braquicefálica (SB) é cada vez mais frequente na rotina clínico cirúrgica de pequenos animais. Os cães acometidos podem apresentar um ou mais componentes anatômicos que causam a obstrução respiratória da SB, a qual a extensão e severidade dos sinais clínicos, além da deterioração da qualidade de vida, demonstram que a reprodução de pacientes com braquicefalia pronunciada é uma preocupação de bem-estar animal (Fawcett et al., 2019).

Os problemas relativos ao sono são amplamente relatados nestes pacientes, permitindo que essa síndrome seja comparada e utilizada como modelo experimental para apneia obstrutiva do sono em humanos (Hendricks et al., 1987; Roedler et al., 2013) e, portanto, as consequências aos distúrbios respiratórios presentes em ambas as síndromes podem ser similares. Apneia obstrutiva do sono (AOS) é uma condição clínica caracterizada por episódios recorrentes de obstrução completa (apneia) ou obstrução parcial (hipopneia) do trato respiratório superior, o que leva ao aumento da pressão negativa intratorácica, fragmentação do sono e hipóxia intermitente durante sono em humanos (Flemons et al., 1999). Esta síndrome é estabelecida como fator de risco para injúria hepática, pela hipóxia crônica que acomete estes pacientes, a qual é altamente correlacionada a estágios progressivos de hepatopatias (Polotsky et al., 2009; Tanné et al., 2005).

Ao contrário da AOS, pouco se sabe a respeito dos efeitos da SB ao parênquima hepático e esplênico dos pacientes acometidos e, menos ainda, se a correção cirúrgica dos componentes primários da síndrome pode diminuir estas possíveis consequências. A hipoxemia crônica inerente a estes cães acarreta consequências ainda pouco elucidadas na medicina veterinária e, pela semelhança funcional da SB à AOS, dá-se a importância de investigação sobre os possíveis efeitos da síndrome aqui estudada em todo aparelho hepático-esplâncnico, além de poder se tornar um recurso prognóstico útil e futuramente se determinar se o procedimento cirúrgico apresenta maiores benefícios a estes tecidos quando realizados em animais jovens.

A técnica de elastografia ARFI (“Acoustic Radiation Force Impulse”) é segura e não invasiva e permite a detecção de alterações precoces e avançadas em parênquima hepático de humanos e cães (Cañas et al., 2015; Friedrich-Rust et al., 2013; Holdsworth et al., 2014; Jeon et al., 2015; Tamura et al., 2019). Desta forma, pode ser estabelecida como forma de avaliação prognóstica de fácil execução. Como já estão estabelecidas medidas fisiológicas de elastografia esplênica e hepática em cães dolicocefálicos saudáveis, destaca-se a importância de definição destas medidas em cães braquicefálicos afetados por diferentes graus da síndrome braquicefálica. Busca-se assim, a comprovação de mais uma consequência da SB além da validação do método de avaliação por meio de elastografia hepático-esplênica em cães braquicefálicos, como ferramenta útil na rotina clínico-cirúrgica veterinária.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A SB é comumente encontrada na rotina de pequenos animais e considerada causa estabelecida de dificuldade respiratória (Hendricks, 1992; Riecks et al., 2007; Dupré et al., 2012; Meola, 2013). Esta síndrome envolve componentes anatômicos primários, que incluem características congênitas, como narinas estenóticas, prolongamento de palato mole, hipoplasia de traqueia, hiperplasia de turbinados nasofaríngeos e macroglossia (Meola, 2013; Jones et al., 2019) além de múltiplos componentes secundários, causados pelo aumento da turbulência e resistência aérea, que incluem edema de palato e laringe, eversão de sacos laríngeos, eversão de tonsilas palatinas e até colapso laríngeo (Koch et al., 2003; Meola, 2013).

Packer et al. (2015) demonstraram que a redução relativa do focinho aumenta dramaticamente o risco da SB. Em adição a estes achados, o aumento da circunferência cervical e a obesidade foram considerados como fatores exacerbantes da SB (Liu et al., 2015; Packer et al., 2015), tal como relatado na medicina humana para AOS (Tanné et al., 2005). A dificuldade respiratória causada pela SB também promove consequências sistêmicas, além das respiratórias (Koch et al., 2003), como evidenciado pelos efeitos inflamatórios sistêmicos (Rancan et al., 2013), gastrintestinais (Lodato e Hedlund, 2012) e cardiovasculares (Hoareau et al., 2012). Desta forma, é sugerido atualmente o termo síndrome braquicefálica no lugar de

síndrome obstrutiva aérea braquicefálica, já que o primeiro aborda uma faixa mais ampla de sinais clínicos (Roedler et al., 2013).

Bulldogues franceses, bulldogues ingleses e pugs são considerados como altamente predispostos a SB (Asher et al., 2009; Njikam et al., 2009; Oechtering, 2010; O'Neill et al., 2015; Packer e Tivers, 2015). Estas raças têm se tornado extremamente populares em todo mundo, culminando grande aumento em seu registro anual nos últimos dez anos, com 343% de aumento em pugs, 2985% em bulldogues franceses e 199% em bulldogues ingleses (The Kennel Club, 2019). O crescimento populacional destas raças implica em maior número de cães braquicefálicos afetados pela SB e raros são os proprietários que reconhecem os sinais clínicos pertinentes à síndrome, e tampouco procuram atendimento veterinário por tais sinais (Packer et al., 2012). Da mesma forma, os efeitos sistêmicos da SB ainda são pouco difundidos entre clínicos e cirurgiões veterinários, devendo-se ressaltar a importância do diagnóstico e da indicação de tratamento cirúrgico a estes pacientes.

Grande parte dos tutores relata intolerância ao exercício, roncos, dispneia inspiratória e, em quadros graves, cianose e episódios de síncope (Roedler et al., 2013; Beausoleil e Mellor, 2015; Packer et al., 2015; Dupré e Heidenreich, 2016). Também é descrito uma variedade de problemas do sono e apneia (Roedler et al., 2013; Beausoleil e Mellor, 2015), sendo que os pacientes podem apresentar episódios de hipoxemia noturna (Koch et al., 2003; Hendricks, 2004; Calvin et al., 2010). Estes cães desenvolvem estratégias para evitar a obstrução de via aérea cranial, assumindo posições corporais particulares durante o sono, como permanecer sentados, com focinho elevado ou ainda dormir com brinquedo entre os dentes, de forma a manter a boca aberta. Em avaliação da síndrome por meio de questionário, 56% dos tutores relataram que seus cães possuíam distúrbios do sono (Roedler et al., 2013).

O exame físico, o histórico e a avaliação das lesões anatômicas por meio de sedação ou anestesia geral são utilizados para diagnóstico da SB (Hendricks, 2004; Lilja-Maula et al., 2017). Estes métodos são subjetivos e/ou invasivos, o que cria dificuldade na avaliação da progressão da doença e efetividade do tratamento em um cenário clínico (Packer et al., 2012; Pratschke, 2014). A severidade e o alcance dos sinais clínicos também são de difícil estimação mesmo com o uso de métodos de diagnóstico por imagem como a endoscopia ou com outras técnicas complementares

como a pletismografia (Doust e Sullivan, 2003; Riecks et al., 2007; Bernaerts et al., 2010; Liu et al., 2015).

O grau da SB tem sido comumente avaliado pela frequência de sinais clínicos reportado pelos tutores (Poncet et al., 2005) ou por meio de avaliação veterinária em testes de exercício (Liu et al., 2015; Lilja-Maula et al., 2017). A graduação funcional por meio destes testes é realizada em escore, o que parece ser mais fidedigno já que foi demonstrado que frequentemente os tutores destes cães não reconhecem ou não percebem os sinais clínicos como problemáticos (Packer et al., 2012). Liu et al. (2015) definiram um sistema de escore numérico (índice SB) para três raças afetadas, bulldogues ingleses, bulldogues franceses e pugs, por moldagem dos dados obtidos na pletismografia de corpo inteiro e por meio de testes de exercício submáximos, que podem relacionar a severidade da SB como forma simples e objetiva de avaliação destes pacientes.

A classificação da SB por teste de exercício submáximo melhora a discussão desta em um cenário científico, além de facilitar a classificação da síndrome em um ambiente clínico-cirúrgico, com a avaliação primária do paciente. Em estudo recente, Riggs et al. (2019) validaram a avaliação clínica por auscultação laringeal antes e após dois testes de exercício submáximo diferentes, comprovando alta sensibilidade do exame clínico para o diagnóstico da SB, particularmente após o teste de trote durante três minutos.

Neste cenário, a síndrome braquicefálica frequentemente requer tratamento cirúrgico para alívio dos sinais clínicos. As técnicas cirúrgicas mais comumente realizadas incluem ressecção em cunha da cartilagem nasal (Bowlit e Moore, 2009), rinoplastia pela técnica de Trader (Huck et al., 2008), estafilectomia (Hobson, 1995), tonsilectomia parcial (Dulisch, 2003) e ventriculectomia (Hobson, 1995). Mais recentemente, técnicas modificadas e avançadas como palatoplastia em retalho dobrado (Haimel e Dupré, 2015), vestibuloplastia nasal (Oechtering e Schuenemann, 2010) e turbinectomia por laser (Oechtering et al., 2016, Liu et al., 2018) têm sido reportadas. O tratamento cirúrgico da síndrome braquicefálica é individualizado para cada cão, a depender da severidade da obstrução aérea e das anormalidades encontradas (Cantatore et al., 2012).

Diversos estudos têm empregado o uso de questionários aos proprietários para a avaliação de resultado cirúrgico (Torrez e Hunt, 2006; Riecks et al., 2007); apesar de suas limitações pela subjetividade de avaliação (Torrez e Hunt, 2006; Pratschke, 2014; Liu et al., 2017). A objetificação do resultado pós-operatório pode ser difícil, devido à complexidade dos sinais clínicos e à necessidade de combinações individuais dos diferentes procedimentos cirúrgicos (Roedler et al., 2013). Desta forma, o uso do índice de SB representa grande avanço sobre os critérios subjetivos previamente utilizados para identificar esta síndrome. Este também possui o potencial de facilitar a prática clínica na monitoração da progressão e na avaliação do resultado cirúrgico (Liu et al., 2015).

Em avaliação pré e pós-operatória, Pohl et al. (2016) demonstraram grande diferença nos distúrbios do sono em pacientes com SB. Previamente à cirurgia, 55% dos proprietários relataram que seus cães apresentavam dificuldade para dormir, incluindo: apenas consegue dormir com focinho elevado (47%), episódios de apneia (47%), tentativas de dormir quando sentado (35%), apneia durante sono (18%), apenas consegue dormir com boca aberta (15%) e dormir muito pouco ou quase nada (9%). Já no pós-operatório, apenas 3% dos proprietários relataram apneia durante sono.

A AOS é uma condição clínica caracterizada por episódios recorrentes de obstrução completa (apneia) do trato respiratório superior em humanos, o que leva ao aumento da pressão negativa intratorácica, fragmentação do sono e hipóxia intermitente durante sono (Drager et al., 2013), assim como o relatado para SB. Recente, estudo definiu que AOS é preditor independente para incidência de doença hepática (Chou et al., 2015) e o risco de esteatose hepática não alcoólica associada à AOS é particularmente alto (Jouët et al., 2007; Kallwitz et al., 2007; Campos et al., 2008; Polotsky et al., 2009; Daltro et al., 2010; Aron-Wisnewsky et al., 2012; Nobili et al., 2014; Pulixi et al., 2014; Sundaram et al., 2014; Corey et al., 2015; Lin et al., 2015; Qi et al., 2016).

Ainda, Tanné et al. (2005) sugeriram que a AOS induz resistência insulínica e hipóxia hepática direta, o que pode estar diretamente envolvido na patogênese da injúria hepática dos pacientes com esta afecção. Polotsky et al. (2009) também examinaram se a AOS e a hipóxia noturna predizem a severidade de esteato-hepatite

em indivíduos severamente obesos apresentados para cirurgia bariátrica e concluíram que pacientes com AOS moderada a severa exibiram maior inflamação lobular hepática em relação a pacientes com AOS discreta. A hipóxia noturna severa também foi associada ao edema de hepatócitos e a fibrose pericelular no parênquima hepático de humanos (Aron-Wisnewsky et al., 2012; Drager et al., 2013). Visto que buldogues ingleses são utilizados como modelos de estudo para humanos com síndrome da apneia (Hendricks et al., 1987), é razoável presumir que outros cães braquicefálicos possam ter semelhança em relação ao risco de apneia do sono, já que a SB divide características com a síndrome obstrutiva da apneia do sono (Crane et al., 2017).

Em hepatopatias crônicas a avaliação da fibrose hepática é essencial, antes realizada apenas por biópsia hepática, considerado como exame padrão ouro para avaliação hepatológica (Gebo et al., 2002). Atualmente métodos não invasivos foram desenvolvidos e são utilizados principalmente em pacientes em que a realização de biópsia é contraindicada. A elastografia, técnica empregada para avaliação da elasticidade tecidual, a qual é utilizada na medicina humana e na veterinária para diferenciar lesões benignas e malignas em diversos órgãos, assim como para diagnóstico de fibrose hepática (Cañas et al., 2015; Friedrich-Rust et al., 2013; Holdsworth et al., 2014; Jeon et al., 2015; Silva et al., 2018).

A análise da rigidez tecidual por ultrassonografia pode ser realizada com aplicação de compressão manual ou mecânica (imagem de elasticidade, elastografia de tensão) ou sem compressão (i.e., do inglês “acoustic radiation force impulse” - ARFI) (Gallotti et al., 2010). A técnica ARFI é segura e não invasiva, e provê medidas quantitativas e qualitativas da rigidez tecidual (Dudea et al., 2011; Feliciano et al., 2014; Holdsworth et al., 2014). Estudos demonstraram que a elastografia ARFI pode ser utilizada como método não invasivo alternativo para a avaliação de fibrose hepática em hepatite crônica humana (Friedrich-Rust et al., 2009). Combinada à elastografia transiente (técnica elastográfica utilizada para avaliação de fibrose hepática por meio de medidor FibroScan; Rivero-Juárez et al., 2012), o método ARFI tem sido demonstrado como altamente específico, cerca de 93%, para predição de fibrose hepática sendo que, se estes dois métodos estão de acordo entre si, a biópsia hepática pode ser evitada (Sporea et al., 2011).

A elastografia esplênica também tem sido empregada no diagnóstico de desordens hepáticas crônicas (Bota et al., 2010; Dudea et al., 2011; Gao et al., 2012) como a cirrose, hipertensão portal (Bota et al., 2010) e algumas alterações vasculares (Ye et al., 2012) em humanos, no qual a rigidez esplênica avaliada pela técnica ARFI é relatada como bom preditor da presença de cirrose hepática (Bota et al., 2010). O desenvolvimento de hipertensão portal é uma consequência comum das doenças hepáticas crônicas, caracterizadas por fibrogênese hepática progressiva e alterações vasculares extensivas que ocorrem tanto no fígado quanto no tecido esplênico (Sanyal et al., 2008).

Apesar da elastografia ser um método de fácil realização em cães (Jeon et al., 2015), ainda são necessários novos estudos para se validar a distinção entre os tecidos normais e os anormais na espécie (Marolf, 2017). Boas relações foram observadas entre gradiente de pressão portal, rigidez esplênica e hepática em estudo com cães (Nedredal et al., 2011), o que sugere relação temporal entre hipertensão portal e desenvolvimento de fibrose hepática. Estudo recente também sugeriu evidências da relação entre a rigidez hepática associada ao aumento da pressão venosa portal causada por doenças em cães (Rotemberg et al., 2013).

Hoareau et al. (2012) demonstraram que cães de raças braquicefálicas (bulldogues ingleses e franceses) são propensas a menor pressão arterial de oxigênio (PaO_2), maiores valores de hematócrito, maior pressão arterial de gás carbônico (PaCO_2) e hipertensão quando comparados aos não braquicefálicos, o que pode ser um mecanismo compensatório para manter a concentração normal de oxigênio arterial. Também foram relatadas evidências de que a hipoxemia crônica que afeta estes pacientes pode ser suficiente para estimulação da produção de eritropoietina, tal como discutido na medicina humana (Calvin et al., 2010), além de estudos sugerirem a presença de estado de hipercoagulação em cães braquicefálicos, que é amplificado pela severidade da síndrome (Crane et al., 2017).

Os efeitos da hipoxemia crônica sobre o parênquima hepático e esplênico destes cães ainda não foram investigados e podem trazer um novo aspecto sobre as consequências da SB, revelando ainda mais a necessidade de controle e avaliação criteriosa do cruzamento das raças, com objetivo principal de bem-estar destes cães,

questão configurada hoje como prejudicial ao bem-estar animal inerente aos tipos morfológicos extremos (Fawcett et al., 2019).

3. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de alterações na rigidez hepática e esplênica de cães afetados pela síndrome braquicefálica, de forma a definir se estas modificações podem ser utilizadas como forma de avaliação prognóstica da síndrome. Com estas definições, objetivou-se também identificar se as possíveis alterações encontradas possuíam relação com o grau de evolução clínica dos pacientes.

Como objetivos específicos têm-se: (1) caracterizar a rigidez dos tecidos hepático e esplênico de cães afetados pela síndrome braquicefálica; (2) correlacionar os dados obtidos com o grau da síndrome braquicefálica de cada paciente; (3) definir se a avaliação ultrassonográfica pelo uso da técnica ARFI pode ser considerado como método para avaliação prognóstica de cães braquicefálicos afetados pela síndrome, avaliada por testes de eficácia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O presente projeto foi avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV-UNESP Câmpus de Jaboticabal, com número de protocolo 17944/2017. Todos os proprietários foram consultados e informados sobre o presente estudo. Expondo sua concordância com as avaliações propostas em termo de consentimento livre (anexo, Apêndice C) seu animal foi autorizado a ser incluso no projeto. Os pacientes selecionados foram acompanhados ambulatoriamente durante todo período experimental.

4.2 Desenho experimental

Este estudo clínico observacional e prospectivo foi dividido em três etapas e o tamanho amostral necessário para cada etapa calculado com ajuda do software G*Power versão 3.1.9.2 (Universidade de Kiel, Alemanha).

Na Etapa 1, foram coletados dados para comparação dos parâmetros elastográficos hepáticos de cães braquicefálicos e mesocefálicos. Para este objetivo o tamanho amostral foi calculado com base nos resultados de Han et al. (2012) e, inicialmente, selecionados 15 cães mesocefálicos hígidos e 30 braquicefálicos (hígidos, acometidos apenas pela SB), o que permitiria a identificação de diferenças de 0,4 m/s na velocidade da onda de cisalhamento do parênquima hepático, com poder estatístico de 89%.

Na Etapa 2, foram coletados dados para comparação dos mesmos parâmetros entre as raças braquicefálicas, pug e buldogue francês, assim como com os cães mesocefálicos. Desta forma, uma amostra mínima de 15 cães por grupo permitiu a identificação de diferenças semelhantes às relatadas na Etapa 1, com poder estatístico de 83%.

Na Etapa 3, foi estudado o efeito da síndrome braquicefálica sobre o parênquima hepático, avaliado pela técnica de elastografia e validadas para tal fim em humanos por Han et al. (2012) e Feng et al. (2016). Desta forma, os cães braquicefálicos foram categorizados em quatro graus de severidade clínica da síndrome, de acordo com a proposta validada por Liu et al. (2015). Também foi acrescentado ao estudo a avaliação clínica do grau de estenose de narina de cada paciente (Liu et al., 2016). Com a amostra referente aos cães braquicefálicos e mesocefálicos estimamos inicialmente ter ao menos 10 indivíduos em cada categoria de severidade da SB, para identificar diferenças na velocidade de onda de cisalhamento hepática de 0,4 m/s com poder estatístico de 71%, segundo os resultados de Feng et al. (2016). De acordo com as categorias descritas obtivemos o número mínimo inicialmente requerido em cada grau da SB.

4.3 Protocolo experimental

4.3.1 Seleção dos pacientes

Os cães incluídos neste estudo foram recrutados durante atendimento no Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Unesp Câmpus Jaboticabal. Cães das raças buldogue francês e pugs foram utilizados como modelos de cães braquicefálicos. Os cães mesocefálicos foram advindos do Laboratório de Nutrição de Cães e Gatos da

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV - Câmpus de Jaboticabal – UNESP, todos cães da raça Beagle, hígidos e fora do período experimental do laboratório, inclusos no estudo como grupo controle. Todos os cães inclusos no estudo apresentaram-se com idade entre um a seis anos e peso corporal entre cinco a 15 quilogramas.

Optou-se por utilizar os cães advindos do Laboratório de Nutrição de Cães e Gatos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV - Câmpus de Jaboticabal – UNESP, da raça beagle com faixa de idade e peso como delimitado acima, a fim de se obter o grupo mesocefálico mais homogêneo quanto ao tamanho e peso corporal. A escolha da raça beagle permite a comparação com as raças braquicefálicas aqui estudadas por similaridade de estatura e peso entre estas, além de permitir a escolha da faixa etária destes cães, sendo utilizada a mesma faixa etária adotada para o grupo braquicefálicos, excluindo assim possíveis variações nas medidas obtidas. Foram excluídos quaisquer cães que não atenderam às classificações descritas ou que apresentaram alterações condizentes com qualquer afecção sistêmica. A influência dos fatores foi considerada e avaliada nas análises estatísticas deste estudo. O protocolo experimental foi realizado conforme a Figura 1.

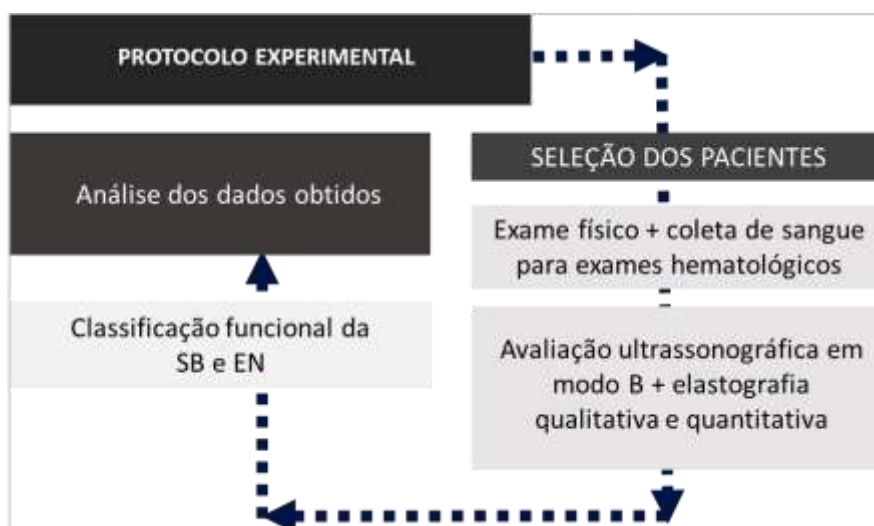


Figura 1. Imagem ilustrativa de diagrama de fluxo exemplificando como o protocolo experimental foi desenvolvido.
SB: síndrome braquicefálica; EN: estenose de narina.

4.3.2 Avaliação perfil hepático e hemograma

Os cães selecionados e inclusos neste estudo tiveram sua condição sistêmica avaliada por meio de hemograma (contagem automática, realizado pela equipe do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – Unesp – FCAV, Jaboticabal – SP) e perfil bioquímico hepático após o exame físico. Foi realizada coleta de sangue por meio de punção venosa em veia jugular com contenção manual dos cães. O perfil bioquímico hepático foi composto de avaliação de atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), marcadores de lesão hepática, e pelos níveis de bilirrubina total, conjugada e não conjugada, já que a diminuição da massa hepática funcional pode resultar em menor captação de bilirrubina não conjugada pelos hepatócitos, diminuição da sua conjugação e de excreção de bilirrubina conjugada (Stockham e Scott, 2011). Também foram incluídas as avaliações de proteína total e albumina sérica para avaliação da função de síntese hepática. Todos os testes bioquímicos foram realizados pelo aparelho LabQuest¹ pelos kits LabTest², no Laboratório de apoio à pesquisa do departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV – Unesp, Jaboticabal – SP.

4.3.3 Exames Ultrassonográficos

Após a coleta de sangue, foi realizada tricotomia ampla do abdômen dos animais, entre a região epigástrica e hipogástrica, compreendida entre o apêndice xifoide e os dois últimos pares de glândulas mamárias, estendendo-se lateralmente na região ventral aos músculos lombares, próximos ao último par de costelas, do lado esquerdo, e sobre os dois últimos pares de costelas, do lado direito para realização dos exames ultrassonográficos do parênquima hepático e esplênico, método semelhante ao adotado por Feliciano et al. (2007).

Após a tricotomia, os animais foram encaminhados para a sala de ultrassonografia. Os cães foram posicionados em decúbito dorsal e/ou lateral por meio da contenção física delicada dos membros, com a cabeça na direção do monitor e corpo paralelo ao aparelho. Antes do exame, foi aplicado gel específico para a

¹ LabTest Diagnóstica - Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Vista Alegre, Lagoa Santa - MG

² LabTest - Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Vista Alegre, Lagoa Santa - MG

realização de ultrassonografia e, para a avaliação destes órgãos não houve necessidade de preparo prévio ou sedação. É ressaltado aqui que os exames ultrassonográficos foram realizados por operador experiente na área, com qualificação para realização dos mesmos.

Os exames foram realizados com a utilização do aparelho ACUSON S2000/SIEMENS, com transdutores multifrequenciais convexo (4MHz) e linear (9MHz). As avaliações ultrassonográficas em modo B foram realizadas anteriormente à técnica de elastografia, em cortes transversais e longitudinais, objetivando-se realizar a varredura do tecido hepático e esplênico dos animais. Identificou-se as regiões propostas e verificou-se a homogeneidade tecidual (ecogenicidade e ecotexturas teciduais) e o tamanho normal desses órgãos nos animais selecionados. Qualquer alteração encontrada nas imagens do modo B, referente à homogeneidade, ecogenicidade e ecotextura tecidual, determinou se o paciente seria ou não incluído na próxima etapa do estudo, de forma a eliminar pacientes com possíveis alterações ainda não detectáveis pelos exames hematológicos. Desta forma, os cães que apresentaram alterações focais, multifocais (nódulos focais, multifocais ou massas) e/ou heterogenicidade difusa foram excluídos do experimento.

4.3.3.1 Elastografia qualitativa e quantitativa

Para a elastografia foi utilizado o aparelho ultrassonográfico ACUSON S2000/SIEMENS com software para caracterização qualitativa e quantificação utilizando o método ARFI (*Virtual Touch Tissue Quantification software*) e transdutores padrões, linear de 9,0 MHz e convexo de 4,0 MHz como previamente relatado (Feliciano et al., 2014; Maronezi et al., 2015).

Utilizando a técnica elastográfica ARFI qualitativa, foram formadas imagens em tons de cinza do tecido hepático e esplênico dos cães, para avaliação da rigidez tecidual relativa (elastograma; Figura 2). Esta informação foi calculada por meio da análise dos deslocamentos relativos de elementos teciduais devido a pulso de pressão acústica. Para a imagem elastograma formada, as regiões claras demonstram que o tecido é mais elástico (menos rígido) do que as regiões escuras. Ademais, essas

imagens foram comparadas às obtidas pela ultrassonografia convencional correspondente.

O método ARFI quantitativo utiliza pulsos acústicos de curta duração para produzir deslocamentos no tecido examinado. Esses deslocamentos são chamados de ondas de cisalhamento, cuja velocidade é proporcional às características elásticas do tecido examinado. A velocidade do som é mais rápida em tecidos mais endurecidos, indicando a rigidez da estrutura (Feliciano et al., 2014). Para a obtenção dos valores para a velocidade de cisalhamento dos tecidos hepático e esplênico foram divididos de acordo com os estudos para padronização dos valores de referência realizados por Holdsworth et al. (2014) e Maronezi et al. (2015), sendo: *Fígado* – avaliações realizadas nos lobos hepáticos esquerdo, direito e caudado (Figura 3), em diferentes profundidades (proximal, medial e distal); *Baço* - avaliações realizadas nas três porções: face gástrica (cranial), face visceral (medial) e face renal (caudal; Figura 4). Em cada porção, foram obtidas no mínimo três amostragens da velocidade de cisalhamento e profundidade, na qual os valores médios da avaliação quantitativa foram expressos em velocidade de propagação tecidual (m/s).



Figura 2. Imagens de elastograma de paciente braquicefálico da raça buldogue francês classificado clinicamente como grau I da síndrome braquicefálica. A) Porção cranial de baço. B) Lobo hepático direito medial. Ambas imagens demonstram homogeneidade do parênquima em coloração de tonalidade cinza escuro.

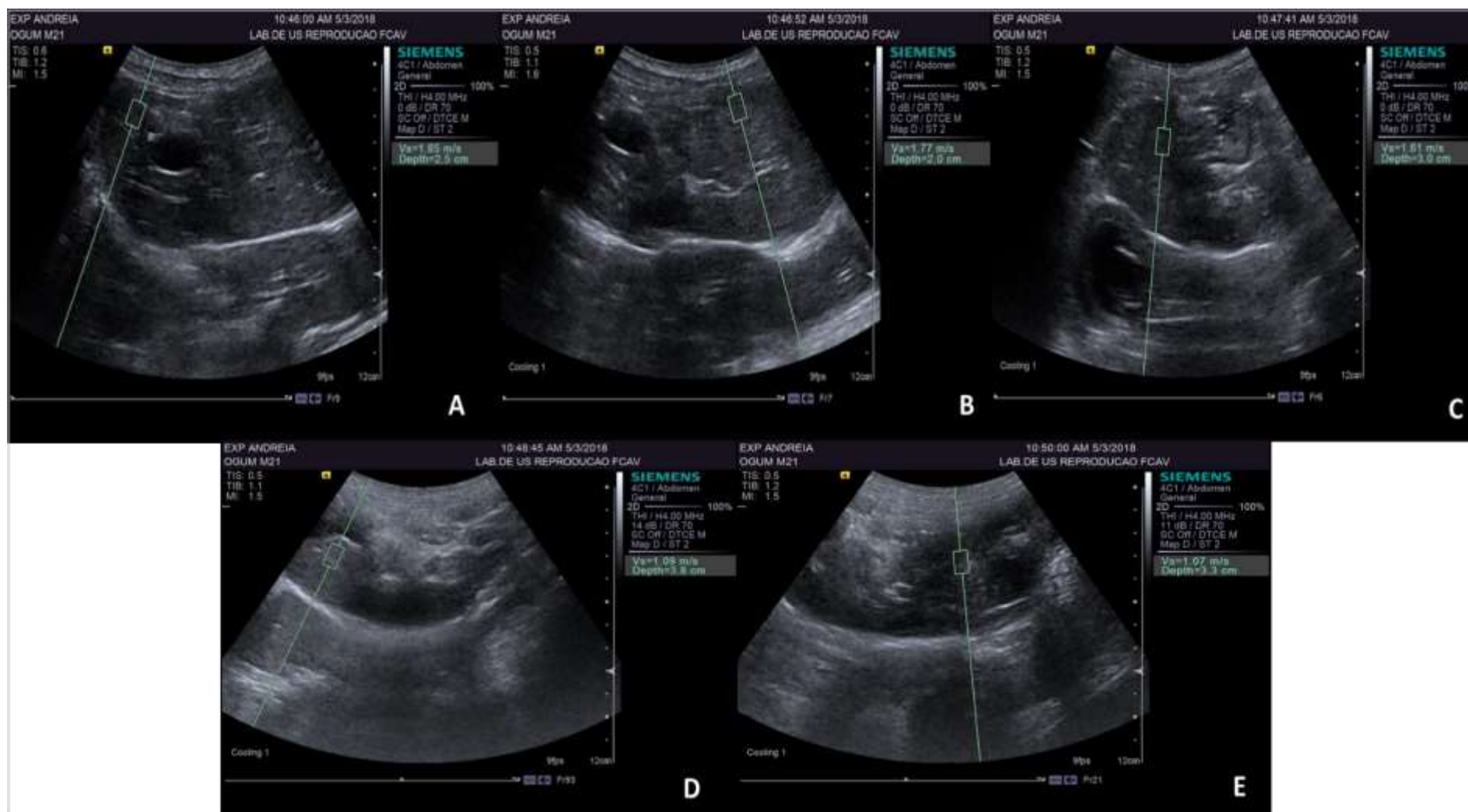


Figura 3. Imagens elastográficas de fígado de paciente braquicefálico da raça buldogue francês classificado clinicamente como grau I da síndrome braquicefálica. A) Lobo direito medial. B) Lobo esquerdo medial. C) Lobo esquerdo lateral. D) Lobo direito lateral. E) Lobo caudado.



Figura 4. Imagens elastográficas de baço de paciente braquicefálico da raça buldogue francês classificado clinicamente como grau I da síndrome braquicefálica. A) Porção cranial de baço. B) Porção de corpo de baço. C) Porção caudal de baço.

4.3.4 Classificação da síndrome braquicefálica e estenose de narina

Foi realizada anamnese geral de cada paciente e foram identificados: gênero, idade, peso e escore corporal, em escala de um a nove de acordo com Laflamme (1997).

Cada paciente braquicefálico foi classificado de acordo com o grau da SB, como relatado por Liu et al. (2015). Este índice estabelece um sistema de escore funcional em quatro graus (Tabela 1), baseado em avaliação clínica e auscultação laringeal realizada antes e após exercício de tolerância ao trote durante três minutos, sendo este também validado recentemente com alta especificidade para diagnóstico da SB por Riggs et al. (2019). O teste de exercício submáximo fora realizado sempre em ambiente aberto, com mesma distância e pelo mesmo avaliador. Os testes foram todos realizados em período de temperatura amena, logo pela manhã, para evitar possíveis interferências da temperatura ambiente.

Foram classificados como grau 0 os cães assintomáticos, sem qualquer sinal da síndrome, grau I aqueles com síndrome discreta, que apresentam sinais respiratórios discretos e não se mostram afetados pelo teste de tolerância ao exercício, assim considerados como clinicamente saudáveis para as raças. Cães com grau II, síndrome moderada, foram aqueles que necessitavam de cuidados médicos como perda de peso e ou tratamento cirúrgico e grau III, com síndrome severa, aqueles que requereram intervenção cirúrgica imediata e foram intolerantes ao exercício, sendo estes dois últimos graus considerados como clinicamente afetados.

A intervenção cirúrgica imediata foi realizada como protocolo terapêutico em 12 cães dos 24 classificados como grau II ou III, utilizando-se a técnica de palatoplastia em retalho dobrado (Haimel e Dupré, 2015) e ressecção em cunha da cartilagem nasal (Bowlit e Moore, 2009). O tratamento clínico e cirúrgico fora indicado a todos os cães classificados como grau II e III da SB, porém, consentido apenas nos casos citados acima.

Tabela 1. Sistema de graduação funcional da síndrome braquicefálica (SB) baseada nos sinais respiratórios antes e após teste de tolerância a exercício (TTE).

		Ruídos respiratórios^a	Esforço inspiratório^b	Dispneia, cianose, síncope^c
Grau 0	Pré TTE	Não audíveis	Ausente	Ausente
	Pós TTE	Não audíveis	Ausente	Ausente
Grau I	Pré TTE	Não audíveis ou discretos	Ausente	Ausente
	Pós TTE	Discretos	Ausente ou discreto	Ausente
Grau II	Pré TTE	Discretos a moderados	Discreto a moderado	Ausente
	Pós TTE	Moderados a severos	Moderado a severo	Dispneia discreta, cianose ou síncope ausentes
Grau III	Pré TTE	Moderados a severos	Moderado a severo	Dispneia moderada a severa, pode ou não apresentar cianose. Intolerância ao exercício
	Pós TTE	Severos	Severo	Dispneia severa, pode ou não apresentar cianose ou síncope.

Este sistema de graduação foi estabelecido e validado previamente (Liu et al., 2015; 2016). A classificação clínica foi baseada em sinais respiratórios antes (pré TTE) e imediatamente após teste de tolerância a exercício de três minutos (pós TTE) com velocidade de trote de aproximadamente 6 a 8 quilômetros por hora realizado pelos investigadores. Apresentação de pelo menos um sinal do grau mais alto determina o resultado final em escore.

^a Sons respiratórios foram diagnosticados por meio de auscultação laríngea. Discretos: aquelas audíveis apenas sob auscultação; moderados: audíveis de forma intermitente, sem a necessidade de estetoscópio; severos: constantemente audíveis, sem necessidade de estetoscópio.

^b Ciclo respiratório anormal caracterizado por evidência de aumento do esforço para inalar o ar, com uso do diafragma e ou músculos acessórios e ou alargamento nasal com aumento de ofegação. Suave: respiração com padrão regular e mínimo uso do diafragma; moderado: evidência de uso do diafragma e músculos acessórios da respiração; severa: marcado uso do diafragma e músculos acessórios da respiração

^c Cães que apresentarem episódios de síncope e ou cianose como documentado pelo tutor, por meio da avaliação por questionário, foram classificados como grau III sem o TTE. Dispneia suave: apresentação de sinais de desconforto; moderada: respiração irregular e sinais de desconforto; severa: respiração irregular com sinais de desconforto e dificuldade respiratória.

Além da avaliação clínica descrita acima, foi realizado avaliação do grau de estenose de narina de cada paciente como validado por Liu et al. (2016). A representação dos quatro graus de estenose estabelecidos é demonstrada na Figura 5; classificadas em narinas abertas; suavemente estenóticas, na qual a parede da narina lateral não tem contato com o septo nasal e imediatamente após o teste de tolerância ao exercício (TTE) as cartilagens alais devem mover dorsolateralmente para abrir durante a inspiração; estenose moderada, na qual a parede da narina lateral toca a parede o septo nasal em sua porção dorsal, com abertura somente na porção ventral, e imediatamente após o TTE e as cartilagens alais não são capazes de se movimentar dorsolateralmente e pode haver alargamento nasal (i.e., contração muscular ao redor do plano nasal, na tentativa de alargamento dos orifícios nasais);

e, por fim, como estenose severa, na qual as narinas são quase completamente fechadas e o cão pode mudar para respiração oral com pouco estresse ou exercícios suaves.

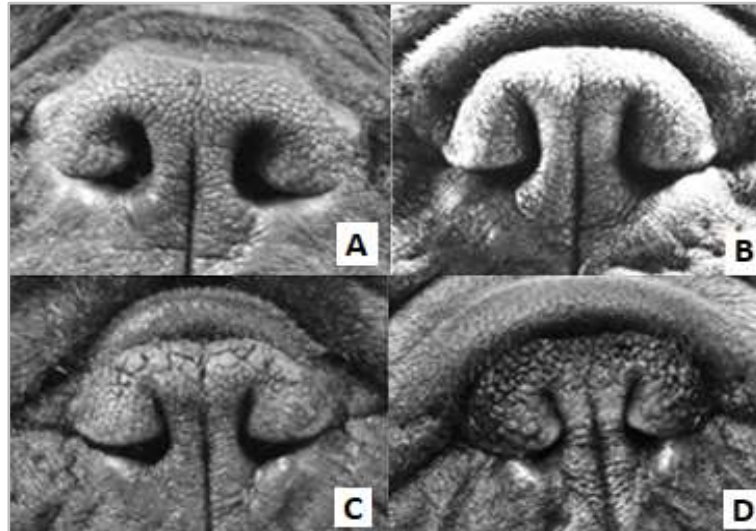


Figura 5. Fotografias do plano nasal de cães braquicefálicos para definição do grau de estenose de narina em bulldogues franceses com diferentes graus segundo Liu et. al (2016). A) Narinas abertas, B) Narinas discretamente estenóticas C) Narinas moderadamente estenóticas D) Narinas severamente estenóticas.

4.3.5 Análise estatística

As variáveis resultantes da avaliação foram analisadas estatisticamente com ajuda do Software R versão 3.3.0 (R Foundation for Statistical Computing, Austria). As velocidades de onda de cisalhamento médias (SWV, i.e., do inglês “shear wave velocity”) são expressas em metros por segundo e a profundidade em centímetros. As variáveis contínuas foram testadas para distribuição dos dados e quando necessário fora realizada transformação dos resíduos a fim de assegurar a suposição de normalidade por meio de transformação Box-cox. Ato contínuo, a distribuição normal foi obtida pelo teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) assim como homocedasticidade das variâncias pelo teste de Bartlett ($p > 0,05$). As três repetições de velocidade de cisalhamento/profundidade para cada área esplênica e para cada lobo hepático foram comparadas entre si pelo teste de análise das variâncias (ANOVA). Não havendo diferença significativa, será utilizada média das três repetições para cada área/lobo.

Em seguida, para verificar se houve diferença significativa entre os valores médios das regiões esplênicas, estes foram comparados pelo mesmo teste. O mesmo foi realizado entre os lobos hepáticos mediais e entre os lobos laterais. Desta forma, não havendo diferença significativa nas avaliações, será utilizada média dos valores de SWV e profundidade de cada região/lobo analisados em conjunto (SWV). O lobo caudado fora analisado individualmente.

Realizada a comparação entre as regiões avaliadas e definidas as médias de SWV esplênicas e dos lobos hepáticos a serem utilizadas nas próximas etapas, as variáveis foram comparadas entre a conformação de crânio, raças, graus da síndrome braquicefálica, graus de estenose de narina e gênero pela análise de variâncias ANOVA no modelo inteiramente casualizado e pós teste de Tukey. Na sequência, a análise de correlação foi realizada entre as variáveis estudadas e as variáveis clínicas pelo teste de Spearman, no qual o tamanho da correlação foi interpretado segundo Hinkle et al. (2003), no qual 0,00 a 0,30 indica correlação insignificante; 0,30 a 0,50 baixa correlação; 0,50 a 0,70 correlação moderada; 0,70 a 0,90 correlação alta e 0,90 a 1 correlação perfeita. Subsequentemente os parâmetros que apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) foram submetidos à análise de componentes principais, tentando identificar os componentes de alteração fisiológica que explicassem a variabilidade dos parâmetros entre os cães braquicefálicos e mesocefálicos. A significância foi fixada para todos os testes em 95% ($p \leq 0,05$). A Figura 6 exemplifica o diagrama de fluxo com as etapas seguidas para análise das variáveis.

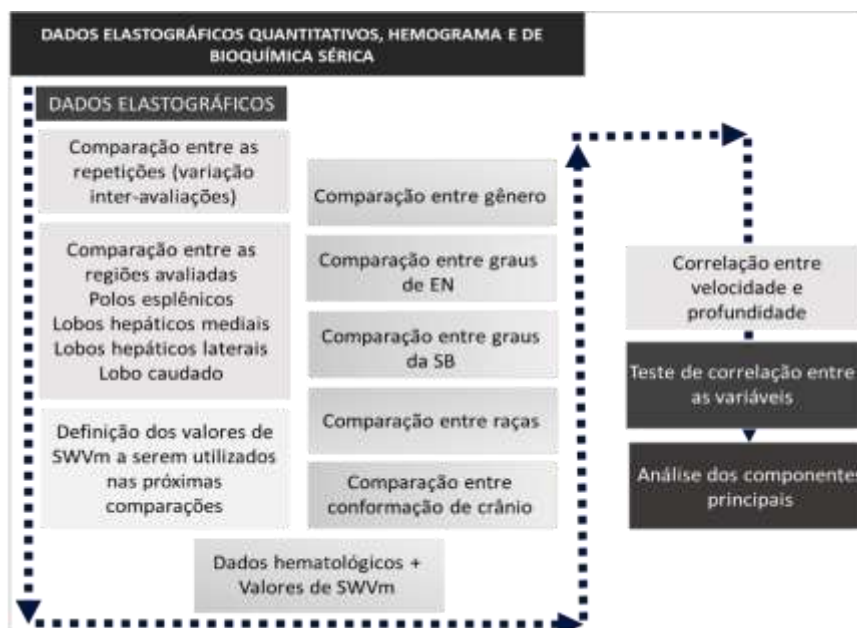


Figura 6. Imagem ilustrativa de diagrama de fluxo representando os passos seguidos para análise das variáveis obtidas no estudo.

SWV: Velocidade da onda de cisalhamento média.

5. RESULTADOS

5.1 Animais

Dos cães selecionados, dois cães braquicefálicos (1 pug e 1 buldogue francês) foram excluídos do estudo por apresentarem alterações condizentes com afecção sistêmica. Ao todo foram inclusos 48 cães braquicefálicos e para o grupo controle foram coletados dados de 22 cães mesocefálicos. Sessenta e quatro por cento (n=31) dos cães braquicefálicos eram da raça buldogue francês e 35% (n=17) cães da raça pug, aproximadamente. Em relação ao gênero dos cães braquicefálicos 35,48% (n=11) foram machos e 64,51% fêmeas (n=20) da raça buldogue francês, 35,29% (n=6) machos e 64,70% (n=11) fêmeas da raça pug e, quanto aos cães mesocefálicos da raça beagle, 45,45% (n=10) foram machos e 54,54% (n=12) fêmeas.

A média de idade obtida em cada raça foi de 2,9 ($\pm 1,43$) anos em buldogues franceses, 3,6 ($\pm 1,81$) anos em pugs e 3,7 ($\pm 0,70$) anos em beagles. A variação de peso de todos os cães selecionados foi de cinco a 15 kg, na qual a média de peso dos cães da raça buldogue francês foi de 12,3 ($\pm 1,77$) kg, 10,6 ($\pm 2,45$) kg nos pugs e 11,7 ($\pm 1,35$) kg nos beagles. A média de peso geral das raças braquicefálicas (buldogues franceses e pugs) foi de 12,06 ($\pm 2,11$) kg. O escore corporal médio dentro de cada raça foi de 5,64 ($\pm 1,14$) para buldogues franceses, 6,94 para pugs ($\pm 1,24$) e 5,95 para beagles ($\pm 0,72$).

A classificação do grau de síndrome braquicefálica foi obtida conforme o descrito na Tabela 1. Na raça buldogue francês 29,03% dos cães foram classificados como grau 0, 29,03% como grau I, 19,35% como grau II e 22,58% como grau III. Dentro da raça pug foram obtidos 11,76% dos cães como grau 0, 23,52% grau I, 41,17% grau II e 23,52% grau III. Considerando o grupo de cães braquicefálicos total, cerca de 22,91% foram classificados como grau 0, 27,08% grau I, 27,08% grau II e 22,91% grau III, sendo que foi cumprido o valor mínimo requerido no desenho experimental de 10 animais por grau da classificação da SB.

Na raça buldogue francês 9,67% dos cães foram classificados com narinas abertas, 38,70% com narinas discretamente estenóticas, 25,80% com narinas moderadamente estenóticas e 25,80% com narinas severamente estenóticas. Para a raça pug 5,88% dos cães foram classificados com narinas abertas, 41,17% com

narinas discretamente estenóticas, 41,17% com narinas moderadamente estenóticas e 11,76% com narinas severamente estenóticas. Do total de cães braquicefálicos, 8,33% foram considerados com narinas abertas, 39,58% com narinas discretamente estenóticas, 31,25% com narinas moderadamente estenóticas e 20,83% com narinas severamente estenóticas.

5.2 Exames ultrassonográfico e hematológicos

5.2.1 Ultrassonografia em modo B

Todos os baços e fígados avaliados pelo exame de ultrassonografia modo B apresentaram ecotextura homogênea, tamanhos normais e contornos finos e regulares. O parênquima hepático apresentou-se hipoeicoico em relação ao tecido esplênico, com ecotextura homogênea e tamanho dentro dos limites normais em todos os cães.

5.2.2 Elastografia ARFI

5.2.2.1 Elastografia ARFI qualitativa

A elastografia qualitativa das porções cranial, corpo e caudal do baço e dos lobos hepáticos avaliados foram realizadas sem dificuldade. Ao elastograma, as regiões avaliadas não se apresentaram deformáveis, eram homogêneas e com tonalidade cinza escuro.

5.2.2.2 Elastografia ARFI quantitativa e exames hematológicos

A elastografia quantitativa das porções cranial, corpo e caudal de baço e dos lobos hepáticos avaliados foram realizadas sem dificuldade. A avaliação entre as repetições de velocidade de cisalhamento e profundidade obtidas em cada área/lobo (variação inter-avaliações) revelou ausência de diferença entre as mesmas ($p>0,05$). Desta forma, a média das medidas de velocidade de cisalhamento (SWV) e profundidade de cada região foi utilizada para as avaliações subsequentes. Os valores médios das velocidades de cisalhamento de cada região esplênica, quando comparados entre si, não apresentaram diferença ($p=0,507$), de forma que a média geral entre as três regiões fora utilizada nas próximas análises. Para os lobos hepáticos direito e esquerdo medial também não houve diferença ($p=0,582$, Tabela 2)

e a média das velocidades de cisalhamento dos dois lobos foi utilizada. Por fim, em relação aos lobos direito e esquerdo lateral houve diferença ($p < 0,001$) e posteriormente as médias de cada lobo foram utilizadas individualmente nas análises. A SWV do lobo caudado também foi utilizada individualmente.

Tabela 2. Resultados da análise de variâncias ANOVA dos valores de velocidade de cisalhamento obtidos (metros por segundo; média $\pm$ desvio padrão) por elastografia ARFI entre diferentes polos esplênicos e entre os lobos hepáticos de cães braquicefálicos e mesocefálicos. Jaboticabal, 2019.

Região:	SWV	Valor de p*
Baço:		
Polo caudal	2,391 (± 0,538)	0,507
Corpo	2,495 (± 0,483)	
Polo Cranial	2,441 (± 0,557)	
Lobos hepáticos:		
Direito medial	1,372 (± 0,459)	0,582
Esquerdo medial	1,328 (± 0,468)	
Esquerdo lateral	1,303 (± 0,471)	<0,001***
Direito lateral	1,056 (± 0,326)	
Caudado	1,083 (± 0,399)	
		-a

* Diferenças significativas obtidas pelo teste de análise das variâncias ANOVA, com níveis de significância em $p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$ e $p \leq 0,001^{***}$. SWV medida em metros por segundo. ^a Não houve comparação entre lobo caudado e outro lobo hepático. ARFI: Acoustic Radiation Force Impulse; SWV: Valores de velocidade da onda de cisalhamento médios.

Com os valores de SWV definidos para o baço e lobos hepáticos, realizou-se comparação destes valores entre as diferentes conformações de crânio, braquicefálico e mesocefálico. Os valores de SWV esplênica ($p = 0,033$) e hepática ($p < 0,001$; Tabela 3) medidos pela técnica ARFI foram maiores nos cães braquicefálicos. Os resultados de hemograma e bioquímica sérica também foram comparados (Tabela 3), nos quais foram observadas maiores médias de hemácias ($p = 0,007$), ALT ($p < 0,001$), AST ($p = 0,028$) e bilirrubina total ($p = 0,003$) nos cães mesocefálicos. Cães braquicefálicos apresentaram maiores médias de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, razão neutrófilos para linfócitos, eosinófilos e monócitos ($p < 0,001$ para todas as comparações).

Tabela 3. Resultados da análise de variâncias ANOVA dos valores de velocidade de cisalhamento média obtidos por elastografia ARFI de tecido esplênico e lobos hepáticos, hemograma e bioquímica sérica (média $\pm$ desvio padrão) entre cães braquicefálicos e mesocefálicos. Jaboticabal, 2019.

SWV (m/s)	Conformação de crânio		Valor de p*
	Braquicefálicos	Mesocefálicos	
Baço	2,51 $\pm$ 0,45	2,29 $\pm$ 0,34	0,033*
Lobos hepáticos mediais	1,52 $\pm$ 0,36	0,96 $\pm$ 0,10	0,0001***
Lobo hepático esquerdo lateral	1,47 $\pm$ 0,47	0,93 $\pm$ 0,11	0,0001***
Lobo direito lateral	1,20 $\pm$ 0,29	0,74 $\pm$ 0,08	0,0001***
Lobo caudado	1,23 $\pm$ 0,39	0,76 $\pm$ 0,10	0,0001***
Hemograma			
Hemácias (uL)	6.930.625 $\pm$ 554.879	7.298.636 $\pm$ 433.802	0,004**
Hemoglobina (g/dL)	17,98 $\pm$ 1,63	18,13 $\pm$ 1,13	0,670
Hematócrito (%)	50,45 $\pm$ 4,54	51,54 $\pm$ 3,42	0,271
Plaquetas (10 ³ /uL)	435.708 $\pm$ 129.991	387.682 $\pm$ 143.212	0,188
Leucócitos (10 ³ /uL)	10813 $\pm$ 2728	8610 $\pm$ 1997	<0,001***
Neutrófilos (10 ³ /uL)	7715 $\pm$ 2385	6058 $\pm$ 1456	<0,001***
Linfócitos (10 ³ /uL)	2155 $\pm$ 1016	2007 $\pm$ 686	<0,001***
Razão N/L	4,87 $\pm$ 4,00	3,20 $\pm$ 0,92	<0,001***
Basófilos (10 ³ /uL)	3 $\pm$ 15	0 $\pm$ 0	0,235
Eosinófilos (10 ³ /uL)	539 $\pm$ 403	241 $\pm$ 17	<0,001***
Monócitos (10 ³ /uL)	427 $\pm$ 373	367 $\pm$ 289	<0,001***
Bioquímica sérica			
AST(uL)	28,23 $\pm$ 9,74	33,09 $\pm$ 7,65	0,028*
ALT (uL)	28,90 $\pm$ 11,30	44,40 $\pm$ 11,7	<0,001***
BT (mg/dL)	0,20 $\pm$ 0,14	0,31 $\pm$ 0,12	0,003**
BD (mg/dL)	0,10 $\pm$ 0,11	0,14 $\pm$ 0,14	0,245
Proteína total (g/dL)	8,54 $\pm$ 1,87	7,86 $\pm$ 2,40	0,245
Albumina (g/dL)	3,24 $\pm$ 0,82	3,44 $\pm$ 0,66	0,292

* Diferenças significativas obtidas pelo teste de análise de variâncias (ANOVA) com níveis de significância em $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$ e $p < 0.001^{***}$. ARFI: Acoustic Radiation Force Impulse; SWV: Valores de velocidade da onda de cisalhamento médios; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; BT: bilirrubina total, BD: bilirrubina direta.

Entre as raças, apenas as SWV obtidas em parênquima esplênico não apresentaram diferença ($p = 0,169$; Tabela 4). Já em relação aos valores obtidos na comparação das SWV hepáticas entre as raças, a raça beagle apresentou menor média ($p < 0,001$; Tabela 4) quando comparada aos buldogues franceses e aos pugs. Quanto aos exames de hemograma e bioquímica sérica (Tabela A1 Apêndice A), pugs apresentaram menor média de hemácias ($p = 0,016$) e hemoglobina ($p = 0,025$), maior média de leucócitos ($p < 0,001$) e menor média de bilirrubina total ($p = 0,001$) enquanto beagles apresentaram maior média de ALT ($p < 0,001$).

As variáveis foram então comparadas entre os graus da síndrome braquicefálica e de estenose da narina (Tabela 4), no qual apenas cães braquicefálicos, que podem

ser acometidos pela síndrome, foram inclusos. As SWV esplênica e dos lobos hepáticos laterais e mediais não apresentaram diferença entre os graus da SB ($p>0,05$). Entretanto, os valores obtidos para o lobo caudado apresentaram diferença para os graus zero e três da SB ($p=0,001$), que apresentaram SWV menores quando comparado aos demais graus. Nesta etapa, dentre as variáveis de hemograma e bioquímica séria (Tabela A2 Apêndice A) cães de grau III da SB apresentaram menor média de albumina ($p=0,042$) do que cães de grau II, porém sem diferença dos cães classificados como graus 0 e I.

Em relação à estenose de narina, apenas o lobo caudado apresentou diferença entre os graus avaliados ($p=0,02$), no qual narinas abertas (A) obtiveram valor de SWV menor comparado às discretamente estenóticas (DE), porém sem diferença com as moderadamente (ME) e severamente estenóticas (SE). Em relação aos exames laboratoriais comparados entre os graus de estenose de narina, apenas hemácias apresentaram-se maior média ($p=0,04$; Tabela A2 do Apêndice A) nos cães classificados com narinas abertas em relação aos graus DE e SE. Entre os gêneros, apenas a SWV do lobo caudado apresentou média menor ($p=0,04$) em machos, e dos parâmetros hematológicos apenas plaquetas obtiveram menor média também em machos (Tabela A1 Apêndice A).

Tabela 4. Resultados da análise de variâncias ANOVA dos valores de velocidade de cisalhamento média (média $\pm$ desvio padrão), obtidos por elastografia ARFI, de tecido esplênico e lobos hepáticos de cães braquicefálicos e mesocefálicos entre as diferentes raças, graus da síndrome braquicefálica, graus de estenose de narina e gênero. Jaboticabal, 2019.

SWV	Raça			Valor de p*	
	Buldogue Francês	Pug	Beagle		
Baço	2,52 ± 0,50	2,47 ± 0,33	2,29 ± 0,34	0,169	
Lobos hepáticos mediais	1,50 ± 0,32 ^a	1,57 ± 0,44 ^a	0,96 ± 0,10 ^b	<0,0001***	
Lobo hepático esquerdo lateral	1,42 ± 0,43 ^a	1,55 ± 0,54 ^a	0,93 ± 0,11 ^b	<0,0001***	
Lobo hepático direito lateral	1,18 ± 0,30 ^a	1,23 ± 0,26 ^a	0,74 ± 0,08 ^b	<0,0001***	
Lobo caudado	1,15 ± 0,29 ^a	1,37 ± 0,52 ^a	0,76 ± 0,10 ^b	<0,0001***	
Grau da síndrome braquicefálica					
	0	I	II	III	
Baço	2,63 ± 0,45	2,59 ± 0,52	2,47 ± 0,40	2,32 ± 0,13	0,365
Lobos hepáticos mediais	1,38 ± 0,28	1,42 ± 0,25	1,72 ± 0,37	1,56 ± 0,45	0,083
Lobo hepático esquerdo lateral	1,23 ± 0,22	1,40 ± 0,44	1,56 ± 0,55	1,68 ± 0,51	0,069
Lobo hepático direito lateral	1,07 ± 0,23	1,17 ± 0,22	1,26 ± 0,32	1,28 ± 0,31	0,306
Lobo caudado	1,00 ± 0,21 ^{ab}	1,39 ± 0,28 ^c	1,41 ± 0,52 ^{bc}	0,99 ± 0,28 ^a	0,001**
Grau de estenose de narina					
	A	DE	ME	SE	
Baço	2,67 ± 0,37	2,60 ± 0,52	2,36 ± 0,45	2,47 ± 0,26	0,391
Lobos hepáticos mediais	1,48 ± 0,26	1,54 ± 0,33	1,54 ± 0,41	1,48 ± 0,39	0,922
Lobo hepático esquerdo lateral	1,28 ± 0,22	1,47 ± 0,44	1,48 ± 0,49	1,53 ± 0,55	0,614
Lobo hepático direito lateral	1,10 ± 0,21	1,29 ± 0,28	1,13 ± 0,21	1,16 ± 0,35	0,378
Lobo caudado	0,88 ± 0,11 ^a	1,42 ± 0,48 ^b	1,16 ± 0,24 ^{ab}	1,10 ± 0,32 ^{ab}	0,021*
Gênero					
	Fêmeas		Machos		
Baço	2,51 ± 0,45		2,32 ± 0,36		0,055
Lobos hepáticos mediais	1,37 ± 0,39		1,30 ± 0,43		0,486
Lobo hepático esquerdo lateral	1,38 ± 0,52		1,17 ± 0,32		0,071
Lobo hepático direito lateral	1,08 ± 0,33		1,00 ± 0,31		0,302
Lobo caudado	1,16 ± 0,44		0,95 ± 0,27		0,042*

* Diferenças significativas obtidas pelo teste de análise das variâncias ANOVA, com níveis de significância em $p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$ e $p \leq 0,001^{***}$. Valores na mesma linha seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si. ARFI: Acoustic Radiation Force Impulse; SWV: Valores de velocidade da onda de cisalhamento médios; Grau de estenose de narina: A: abertas, DE: discretamente estenóticas, ME: moderadamente estenóticas, SE: severamente estenóticas.

5.2.2.3 Análise de correlação

Fora criada tabela de correlação pelo teste de Spearman a fim de estimar a força e direção da relação linear entre pares das variáveis quantitativas e qualitativas (Figura 7). Os valores de SWV nos lobos hepáticos mediais ($p<0,001$ e $r=0,555$) e laterais direito ($p<0,001$ e $r=0,561$) e esquerdo ($p<0,001$ e $r=0,560$) apresentaram correlação moderada com os graus da SB. Os mesmos lobos obtiveram correlação baixa com graus de EN (lobos mediais $p<0,001$ e $r=0,451$; lobos laterais esquerdo $p<0,001$ e $r=0,446$ e direito $p<0,001$ e $r=0,417$). Os valores de SWV do lobo caudado também apresentaram correlação baixa com grau da SB e grau de EN ($p=0,008$ e $r=0,315$, $p=0,007$ e $r=0,321$, respectivamente). Apenas a SWV dos lobos hepáticos mediais apresentou correlação baixa com o escore corporal ($p=0,002$, $r=0,37$). Pelo teste de correlação entre as SWV e Pm, apenas as velocidades do polo caudal e cranial do baço, lobo hepático direito lateral e lobo caudado apresentaram correlação significativa e negativa com a profundidade correspondente (Tabela 5).

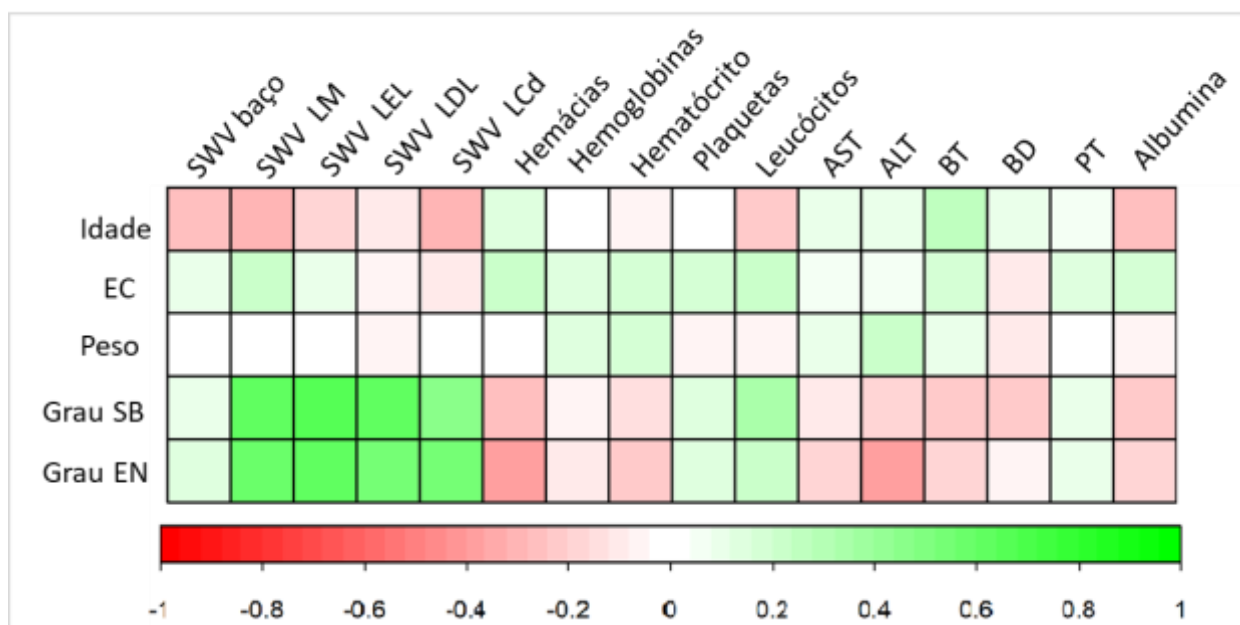


Figura 7. Imagem ilustrativa da análise de correlação das variáveis qualitativas e quantitativas pelo método de Spearman.

SWV: velocidade da onda de cisalhamento média; LM: lobos hepáticos mediais; LEL: lobo hepático esquerdo lateral; LDL: lobo hepático direito lateral; LCd: lobo hepático caudado; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; EC: escore corporal; SB: síndrome braquicefálica; EN: estenose de narina.

Tabela 5. Valores para coeficiente de correlação (r) entre as medidas de velocidade da onda de cisalhamento e respectiva profundidade de medição, obtidas por meio de elastografia ARFI, entre os polos esplênicos e lobos hepáticos de cães braquicefálicos e mesocefálicos. Jaboticabal, 2019.

Velocidade e profundidade ^a	Coeficiente de correlação (r)	valor de p*
Baço:		
Polo caudal	-0,262	0,028*
Corpo	-0,045	0,714
Polo cranial	-0,032	0,006**
Lobo hepático:		
Direito medial	0,039	0,747
Esquerdo medial	-0,128	0,292
Esquerdo lateral	-0,064	0,599
Direito lateral	-0,419	0,001***
Caudado	-0,402	0,001***

* Diferenças significativas obtidas pelo teste de correlação de Spearman com níveis de significância em $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$ e $p < 0,001^{***}$. ARFI: Acoustic Radiation Force Impulse; ^a Velocidade da onda de cisalhamento média (SWV), em metros por segundo, e profundidade média (Pm) em centímetros;

5.2.2.4 Análise dos componentes principais

Após as comparações entre os grupos, os parâmetros que mostraram significância entre as conformações de crânio foram submetidos à análise de componentes principais para avaliar a variabilidade existente entre os mesmos. O resultado da análise (Figura 8) demonstra que em dois componentes (eixo x 45,5% e eixo y 25,4%) se explica 70% das variações significativas entre as conformações de crânio, sendo o componente principal (eixo x) representado pelo aumento das variáveis SWV lobo caudado (LCd), SWV lobo esquerdo lateral (LEL) e SWV lobos mediais (LM) em cães braquicefálicos, e que se contrapõem aos parâmetros hemoglobina, hematócrito, eritrócitos e ALT, maiores nos cães mesocefálicos.

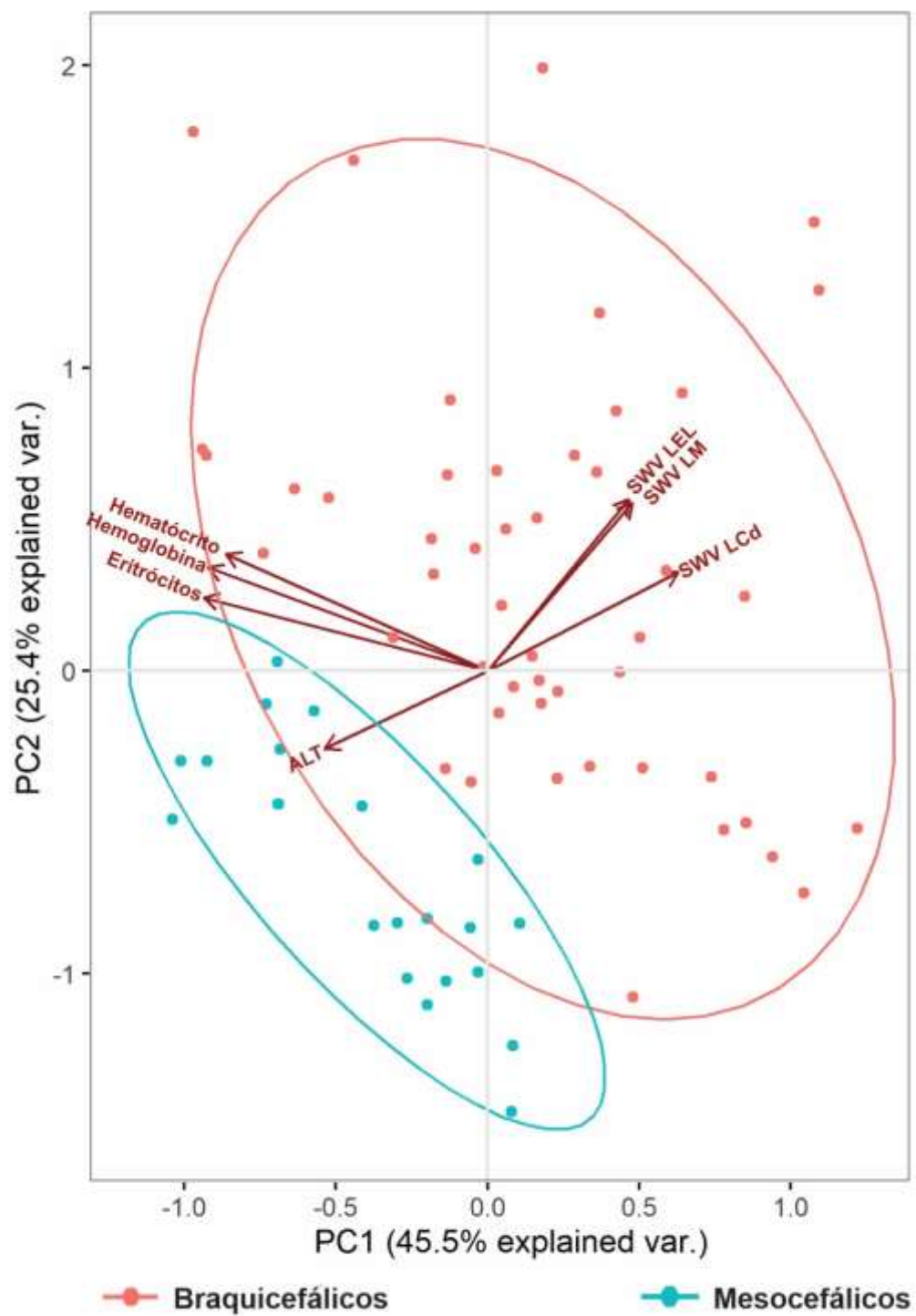


Figura 8. Gráfico de análise dos componentes principais de amostras de elastografia quantitativa de baço e fígado e análises hematológicas de hemograma e bioquímica sérica de cães braquicefálicos e mesocefálicos demonstra agrupamento das análises.

SWV: velocidade da onda de cisalhamento média; LEL: lobo hepático esquerdo lateral; LM: lobos hepáticos mediais; LCd: lobo hepático caudado; ALT: alanina aminotransferase.

6. DISCUSSÃO

A avaliação do parênquima hepático e esplênico de cães afetados pela SB pode trazer informações importantes sobre os efeitos sistêmicos desta síndrome, que podem ser similares aos decorrentes da AOS, a qual é correlacionada a distúrbios metabólicos, inflamatórios, cardiovasculares e ao desenvolvimento de esteato-hepatite não alcoólica (Tanné et al., 2005; Parati et al., 2014). Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a prover medidas de elastografia ARFI de fígado e baço de cães afetados pela síndrome braquicefálica e a comprovar que a rigidez tecidual hepática e esplênica destes cães difere significativamente de cães mesocefálicos. Apesar do risco para desenvolvimento de injúria hepática não ser bem definido para cães braquicefálicos, como na AOS, os dados do presente estudo representam um indicativo de tal risco, uma vez que os cães braquicefálicos apresentam valores de rigidez tecidual hepática e esplênica significativamente maiores e associados a valores elevados de um indicador de inflamação subclínica, a razão neutrófilos-linfócitos.

Os fatores que ocasionam a injúria hepática configurada como esteato-hepatite não alcoólica na AOS (Chou et al., 2015) resultam em inflamação do parênquima e consequente fibrose hepática, a qual é uma resposta de cicatrização tecidual (Wynn, 2007). Como a velocidade de cisalhamento da elastografia depende da rigidez tecidual, esta é altamente influenciada pela quantidade de fibrose presente e representa assim um bom biomarcador para fibrose hepática (Sporea et al., 2010), no qual altas velocidades confirmam a presença de fibrose hepática em crianças (Hanquinet et al., 2013b; Phelps et al., 2017) assim como em cães (Feng et al., 2016; Tamura et. al, 2019). Neste contexto, os valores elevados de rigidez hepática de cães braquicefálicos do presente estudo abrem cenário para discussão de esta ser possivelmente mais uma consequência sistêmica da síndrome braquicefálica.

Estudos demonstram a correlação de valores de elastografia ARFI com a graduação histopatológica de fibrose hepática em crianças, no qual crianças saudáveis apresentaram SWV hepática média de 1,12 m/s enquanto crianças afetadas pela fibrose tecidual apresentaram valor preditivo SWV de 1,34 m/s para escores de classificação histopatológica de fibrose hepática (Hanquinet et al., 2013b).

Quando comparados aos cães mesocefálicos, a diferença das SWV dos cães braquicefálicos foram ainda maiores do que demonstram os estudos entre crianças. Enquanto aqui os valores de SWV diferiram em média 0.509 m/s entre cães braquicefálicos e mesocefálicos, estudos humanos demonstram diferenças médias entre controles e crianças afetadas de 0,220 m/s (Hanquinet et al., 2013b), 0,460 m/s (Picó Aliaga et al., 2015) e 0,360 m/s (Cañas et al., 2015; Eiler et al., 2012; Matos et al., 2014; Phelps et al., 2017). Os valores de velocidade de cisalhamento de parênquima hepático e esplênico de cães braquicefálicos ainda não são descritos na literatura, porém, ressalta-se a similaridade de aumento da SWV em cães braquicefálicos como observado em crianças com fibrose hepática.

Entretanto, alguns estudos citam que a detecção de valores altos de SWV pela técnica ARFI ainda não diferem a lesão hepática encontrada entre fibrose e inflamação do parênquima. Maior rigidez tecidual foi encontrada em crianças em que a fibrose hepática era associada à inflamação, porém, com sobreposição dos valores de rigidez entre diferentes graus de fibrose e inflamação (Phelps et al., 2017). Neste contexto, os dados aqui apresentados indicam a necessidade de futuras investigações e o uso de exame histopatológico é necessário para a confirmação de que cães braquicefálicos afetados pela SB possuem injúria hepática tecidual. Ademais, o mesmo é necessário para definir quais componentes caracterizam a maior rigidez hepática destes cães, formular pontos de corte em que a SWV do parênquima hepático possa indicar o início da possível lesão, inflamatória ou de fibrose, assim como estabelecer melhor valor prognóstico. O procedimento de biópsia hepática em cães requer sedação e envolve riscos intrínsecos (Lidbury, 2017) e, como os pacientes selecionados para o presente estudo eram considerados como saudáveis pelos tutores (i.e., eram afetados apenas pela SB) assim como os cães controle, não houve justificativa para realização de biópsia hepática. Porém, os valores aqui estabelecidos podem embasar futuros estudos e justificar o uso do exame histopatológico.

Os valores de leucócitos e razão neutrófilos-linfócitos, o último utilizado como biomarcador de resposta inflamatória (Bozkuş et al., 2018; Saliccioli et al., 2015), apresentaram maiores médias nos cães braquicefálicos e contribuem para suspeita de que a maior rigidez hepática e esplênica encontrada neste grupo condizem com,

ao menos, inflamação parenquimal. Da mesma forma pacientes humanos afetados pela AOS também demonstram altos níveis da razão neutrófilos-linfócitos que variam com a severidade da síndrome (Yenigun and Karamanli, 2015) e que foram reduzidos significativamente após o tratamento com pressão positiva contínua nas vias aéreas (Al-Halawani et al., 2020; Yenigun and Karamanli, 2015). Ademais, altos níveis da razão neutrófilos-linfócitos foram descritos em cães afetados pela síndrome de resposta inflamatória sistêmica (Pierini et al., 2019) e peritonite séptica (Hodgson et al., 2018) mas ainda não descritos em cães afetados pela SB.

Neste cenário, os dados aqui apresentados demonstram a existência de um estado de inflamação subaguda nos cães braquicefálicos, o que corrobora prévias evidências de que a SB ocasiona tal estado e consequências inflamatórias sistêmicas (Gianella et al., 2019; Lisa et al., 2013). Portanto, o papel da hipoxemia crônica na SB ganha peso, os valores elevados de rigidez hepática podem indicar que estes cães são realmente afetados por uma resposta inflamatória tecidual à tal hipoxemia e podem apresentar alterações hepáticas parenquimais semelhantes aquelas que conjecturam a esteato-hepatite não alcoólica na AOS, que assim podem ocasionar futuros estágios de fibrose tecidual. Dados sobre o índice de afecções hepáticas e causas de mortalidade em cães braquicefálicos não foram ainda relatados o que dificulta a correlação com os achados do presente estudo.

É importante ressaltar que os tecidos de trato respiratório superior sofrem um trauma mecânico direto, imposto pelas altas pressões negativas crônicas da obstrução respiratória superior. Como reportado em humanos afetados pela AOS, estes traumas podem gerar dano em nervos e fibras musculares, assim como nos tecidos faríngeais (Petrof et al., 1996; Sekosan et al., 1996) e a lesão muscular presente pode apresentar papel importante na produção de mediadores pró inflamatórios (Nagaraju et al., 1998). Como discutido, os resultados aqui descritos apontam um estado de inflamação sistêmica subaguda que se assemelha ao quadro de inflamação sistêmica observada na AOS (Inancli et al., 2009), porém, deve-se considerar que a inflamação e lesão local de tecidos do trato respiratório cranial possa ter papel envolvido nos resultados aqui descritos, já que a inflamação e lesão muscular de tecidos de trato respiratório cranial também foi identificada em cães afetados pela SB (Belch et al., 2017; Pichetto et al., 2011).

Valores de elasticidade hepática, obtidos por técnica ARFI, do parênquima hepático de cães dolicocefálicos e mesocefálicos saudáveis foram descritos por Holdsworth et al. (2014), os quais foram maiores (SWV média 1,09–1,71 m/s a 2–4 cm) do que os valores aqui relatados de SWV dos cães mesocefálicos. Entretanto, o presente trabalho identificou valores de SWV para cada lobo hepático individualmente e não apresentou média geral para o órgão, como descrito por Holdsworth et al. (2014), além de incluir um número maior de cães mesocefálicos da mesma raça, o que pode explicar tal variação. Em relação ao valor médio de SWV para baço (2,296 m/s), os cães mesocefálicos apresentaram aqui média semelhante ao previamente relatado pelo grupo envolvido na presente pesquisa (Maronezi et al., 2015) de 2,243 m/s em cães de raças cruzadas mas com faixa de peso semelhante à aqui adotada.

Ye et al. (2012) observaram que valores de rigidez hepática e esplênica foram preditores confiáveis à presença de fibrose hepática, com valor de corte de SWV esplênica de 2,72 m/s para predizer presença de fibrose hepática em grau histológico avançado em humanos. Canãs et al. (2015) também descreveram valores de SWV esplênica significativamente maior em pacientes portadores de fibrose cística com ou sem envolvimento hepático, no qual crianças saudáveis apresentaram SWV esplênica de 2,16 m/s enquanto as crianças afetadas apresentaram SWV esplênica de 2,51 m/s. Estes achados são semelhantes à diferença significativa aqui observada entre a SWV esplênica de cães braquicefálicos (2,51 m/s) e cães mesocefálicos (2,29 m/s), fato este que pode sugerir envolvimento esplênico concomitante à possível injúria hepática causada pela hipoxemia e efeitos sistêmicos da SB nestes cães. Da mesma maneira, o estudo histopatológico pode fornecer informações importantes sobre a natureza da maior média de SWV esplênica de cães braquicefálicos, além de estabelecer valores de corte de SWV esplênica como preditor de alteração/injúria hepática nestes cães.

A comparação entre os valores aqui obtidos de SWV a estudos humanos pode apresentar algumas semelhanças, mas é limitada pela diferença entre as espécies e devido a fatores ligados a execução da elastografia. No presente estudo foram utilizadas duas probes para realização dos exames ultrassonográficos, no qual a probe convexa de 4-MHz foi utilizada para avaliações hepáticas e a linear de 9-MHz para avaliações esplênicas. Como relatado na medicina, a escolha da probe depende da idade e tamanho corporal do paciente. A probe de alta frequência pode favorecer

melhor avaliação do parênquima hepático em crianças menores do que cinco anos de idade, com melhor posicionamento da região de interesse (ROI, i.e., do inglês 'region of interest') longe de vasos e ductos biliares, devido à sua posição relativamente superficial (Hanquinet et al., 2013a). Porém, devido às diferenças anatômicas, o fígado de cães possui localização mais profunda, especialmente nas raças braquicefálicas que apresentam tórax profundo (Gibbs, 1981), de forma que a probe linear de alta frequência foi utilizada neste estudo apenas nas avaliações esplênicas, mais superficiais, e a probe convexa nas avaliações hepáticas.

Apenas alguns estudos citam em qual lobo fora obtido o valor de SWV hepática. Geralmente o valor é advindo do lobo hepático direito, sendo relatado que o lobo hepático esquerdo pode apresentar valores de SWV maiores do que o lobo direito em crianças (Cañas et al., 2015) e adultos (Friedrich-Rust et al., 2012). Isto pode ser explicado devido ao lobo hepático esquerdo ser mais propenso à compressão da probe ou mais susceptível a movimentos cardiovasculares (Friedrich-Rust et al., 2013) que podem alterar os valores de SWV. A maior área do lobo direito também pode facilitar o posicionamento da ROI para elastografia (Grgurevic et al., 2011). O mesmo fato foi observado aqui, onde os lobos laterais apresentaram diferença significativa com maior SWV no lobo lateral esquerdo, e sem diferença entre as médias dos lobos mediais direito e esquerdo. O único estudo em que a obtenção destes valores em cães saudáveis foi relatada, não detalha qual lobo hepático fora utilizado (Holdsworth et al., 2014). No que diz respeito a elastografia esplênica, no presente estudo não foi observada diferença em relação aos valores obtidos nos diferentes polos esplênicos, como também relatado por Maronezi et al. (2015).

Outro fator de influência para as medidas obtidas por técnica ARFI relatado na literatura é a profundidade em que as velocidades são obtidas. Estudos em crianças (Cañas et al., 2015) e em cães (Holdsworth et al., 2014) relatam que a profundidade das medidas tem relação significativa com os valores de SWV, no qual as velocidades são discretamente menores quando medidas são realizadas em localizações mais profundas. O mesmo foi observado no presente estudo, com coeficiente de correlação negativo entre a profundidade e as velocidades obtidas nos polos caudal e cranial de baço e lobos direito lateral e caudado de fígado. Os outros lobos hepáticos avaliados não apresentaram correlação significativa com a profundidade, como também relatado

por dois estudos em crianças (Eiler et al., 2012; Hanquinet et al., 2013a). A explicação para este fato consiste na susceptibilidade de maior compressão da probe em tecidos mais superficiais, presença de conteúdo fibroso da cápsula hepática (Friedrich-Rust et al., 2013) ou até mesmo na perda de intensidade do pulso acústico no parênquima, resultando em uma aplicação de tensão menor em regiões mais profundas e consequentemente menores velocidades (Cañas et al., 2015).

Alguns estudos relatam que não houve interferência do gênero nos valores de SWV hepática de adultos (Son et al., 2012), também como descrito para crianças, em que as médias obtidas em meninos não apresentaram diferença significativa de meninas, apesar dos valores discretamente mais altos (Matos et al., 2014). No presente trabalho, apenas a SWV do lobo caudado apresentou diferença significativa, com maior média observada nas fêmeas. Este achado contraria ao relatado por Holdsworth et al. (2014), no qual cães machos apresentaram maiores valores de velocidade de cisalhamento média hepática e valores significativamente maiores de SWV esplênica em fêmeas. Entretanto, o estudo referido apresentou baixo número de cães comparado ao aqui apresentado além de grande diversidade racial, o que pode explicar as diferenças obtidas.

O peso corporal e circunferência da cintura também possuem correlação importante com a severidade da AOS e presença de injúria hepática (Trzepizur et al., 2018). Em nosso estudo, foi observada correlação significativa, porém fraca, entre o escore corporal apenas com a SWV dos lobos mediais. Entretanto, o peso e o escore corporal também são associados com graus mais severos da SB (Liu et al., 2017) e talvez a população de cães deste estudo não tenha sido representativa o suficiente para demonstrar o efeito do escore corporal em nossos resultados, como observado na AOS.

A idade dos pacientes avaliados pode representar um fator de influência nas medidas obtidas por técnica ARFI (Lee et al., 2013) e diferenças significativas foram encontradas em crianças com menos de seis anos de idade (Matos et al., 2014). Porém, um estudo em cães demonstrou não obter diferenças entre valores de velocidade de cisalhamento esplênica em diferentes idades (Maronezi et al., 2015). A faixa etária dos pacientes inclusos no estudo foi limitada, uma vez que os efeitos secundários da SB são crônicos e pacientes mais velhos sofrem com a hipoxemia e

esforço respiratório a mais tempo, de forma a evitar assim que a idade dos cães do presente estudo fosse um fator de influência para rigidez tecidual e, dentro da faixa estabelecida, não houve correlação entre idade e valores de SWV.

A SB pode ser causada por diferentes características anatômicas em cada paciente, de forma que a apresentação clínica da síndrome pode ser observada em diferentes graus de severidade. O uso de pletismografia de corpo inteiro tem sido empregado como ferramenta de triagem para avaliação da gravidade da SB (Bernaerts et al., 2010; Liu et al., 2015, 2016), porém o uso deste artifício ainda é limitado devido ao custo e tempo necessário para aplicação do teste. Desta forma, alguns estudos validam o uso do testes de tolerância ao exercício como ferramenta útil para avaliação da SB em um cenário clínico (Lilja-Maula et al., 2017; Riggs et al., 2019). A segunda hipótese de nosso trabalho consistia em que cães com graus da síndrome mais severos (graus 2 e 3) apresentariam maior modificação na elasticidade hepática e esplênica do que os cães com graus mais amenos (graus 0 e 1), entretanto, diferença significativa foi notada apenas na SWV do lobo caudado, onde os grau 0 e 3 se apresentaram diferentes dos demais.

A falta de correlação entre a severidade da SB e a rigidez tecidual pode ter ocorrido devido à faixa etária estrita dos pacientes incluídos no presente estudo. Uma vez que a elastografia ARFI pode apresentar um fator de sobreposição dos valores de velocidade entre a inflamação e fibrose tecidual (Phelps et al., 2017), pode ser que a faixa etária escolhida, com pacientes relativamente novos, tenha apresentado apenas o início de inflamação tecidual e não propriamente fibrose, já que a SB é comparada a OSA humana, preditora de alterações metabólicas e inflamatórias sistêmicas (Lisa et al., 2013; Parati et al., 2014). Desta maneira, supõe-se que maiores alterações teciduais e diferenças entre os graus da SB poderiam ser observados em cães mais velhos, nos quais os efeitos da SB possam ser mais avançados. Ademais, ao longo da execução do projeto, foi notória a curva de aprendizado para realização da classificação funcional da SB, o que também pode ter agido como viés desta análise.

Em relação aos graus de estenose de narina, foi detectada diferença significativa apenas para o lobo caudado, que apresentou maior SWV para narinas discretamente estenóticas, apesar da estenose de narina ser demonstrada como forte preditor para SB (Liu et al., 2017). Entretanto, como citado anteriormente, a SB pode

ser causada por diferentes características anatômicas em cada raça e/ou animal, de forma que não é o único ou principal fator que resulta em hipoxemia na SB. Neste sentido, seriam necessários exames de tomografia computadorizada e laringoscopia, a fim de definir quais componentes anatômicos eram presentes em cada paciente e correlacionar a presença de cada componente com os valores de SWV aqui obtidos.

Em estudo comparando cães braquicefálicos e meso/dolicocefálicos, Hoareau et al. (2012) detectaram maiores índices de hematócrito nos cães braquicefálicos, com média de 48%. No presente estudo, os cães mesocefálicos apresentaram maior média do hematócrito do que os cães braquicefálicos, porém, ressaltamos o maior número de cães aqui incluídos de forma que a diferença do encontrado por Hoareau et al. (2012) pode ser explicada pelo baixo número e maior variedade racial de cães inclusos no referido estudo.

A prevalência de níveis alterados de enzimas hepáticas em pacientes humanos afetados pela AOS foi semelhante a observada em pacientes obesos (Rigaud, 1999). Pode ser hipotetizado que estes achados são exclusivamente devido à relação com o sobrepeso, que é o maior fator de risco para pacientes com AOS. Porém, em análise multivariada, AOS severa foi um fator de risco independente, sugerindo o papel da AOS na injúria hepática independentemente da relação massa/peso (Tanné et al., 2005). Isto é consistente com os achados por Kim et al. (2018), que demonstraram que o uso de pressão positiva contínua nas vias aéreas como tratamento para OSA em pacientes obesos foi associado à diminuição significativa dos níveis de aminotransferase. Dados semelhantes foram relatados em crianças com esteatose hepática não alcoólica (Nobili et al., 2014; Sundaram et al., 2014). Entretanto, não é bem definido se cães braquicefálicos, portadores da SB, também possuem risco para desenvolvimento de injúria hepática e quais alterações bioquímicas podem ser detectadas.

Neste contexto, estudo com elastografia ARFI em crianças obesas demonstrou excelente correlação dos valores de SWV com preditor bioquímico de fibrose hepática (razão AST/ALT), de forma a estabelecer este método como ferramenta não invasiva para detecção de esteato-hepatite não alcoólica, principalmente em pacientes pediátricos em que nem sempre a biópsia hepática é uma opção diagnóstica (Kamble et al., 2017). Entretanto, a razão entre AST/ALT não configura bom preditor de fibrose

hepática em cães, sem diferença significativa e sobreposição dos valores obtidos em cães saudáveis e portadores de hepatopatias, provavelmente devido a diferença da dinâmica da AST entre cães e humanos (Raghu et al., 2018). Desta forma, a atividade sérica das enzimas ALT e AST foi avaliada individualmente no presente estudo, assim como a concentração de bilirrubina total.

ALT e AST são enzimas utilizadas para avaliação de alterações necroinflamatórias hepáticas em cães, mas também podem ter sua atividade aumentada por outras fontes, assim como a bilirrubina total (BT), utilizada para avaliação de função hepática (Lawrence e Steiner, 2017). Este fato pode explicar os valores médios de ALT, AST e BT aqui encontrados, maiores nos cães mesocefálicos, como também demonstrado pela análise dos componentes principais. O nível sérico médio de albumina, medidor da função de síntese hepática (Lawrence e Steiner, 2017), foi menor em pacientes braquicefálicos classificados como grau 3 da SB, o que pode indicar menor funcionalidade hepática nestes pacientes.

Por fim, justifica-se a escolha das raças pug e buldogue francês no presente estudo pela similaridade de estatura e peso entre elas. Não obstante, como buldogues ingleses são utilizados como modelos de estudo para AOS (Hendricks et al., 1987), é razoável presumir que outros cães braquicefálicos possam ter semelhança em relação a esta hipoxemia, similar à apneia do sono, assim como para seus efeitos o que corrobora a escolha das raças aqui incluídas.

7. CONCLUSÕES

Cães braquicefálicos da raça pug e buldogue francês apresentam maior rigidez de parênquima esplênico e hepático quando comparados a cães mesocefálicos por meio de avaliação elastográfica ARFI assim como níveis maiores da razão neutrófilos-linfócitos. Na ausência de escores validados para avaliação da fibrose por técnica ARFI em cães, futuros estudos histopatológicos são necessários para estabelecer se a maior rigidez tecidual aqui descrita pode ser correlacionada aos graus de inflamação ou fibrose hepática, como observado em humanos afetados pela AOS, além de comprovar o papel da rigidez esplênica neste cenário. Este estudo permite a identificação de mais uma consequência da SB, somando esforço para detecção

precoce e não invasiva dos efeitos da hipoxemia em fígado e baço de cães braquicefálicos.

8. REFERÊNCIAS

- Al-Halawani M, Kyung C, Liang F, Kaplan I, Moon J, Clerger G, Sabin B, Barnes A, Al-Ajam M. (2020) Treatment of obstructive sleep apnea with CPAP improves chronic inflammation measured by neutrophil-to-lymphocyte ratio. **Journal of Clinical Sleep Medicine** 16, 251–257
- Aron-Wisnewsky J, Minville C, Tordjman J, Lévy P, Bouillot JL, Basdevant A, Bedossa P, Clément K, Pépin JL (2012) Chronic intermittent hypoxia is a major trigger for non-alcoholic fatty liver disease in morbid obese. **Journal of hepatology** 56(1):225-233
- Asher L, Diesel G, Summers JF, McGreevy PD, Collins LM (2009) Inherited defects in pedigree dogs. Part 1: Disorders related to breed standards. **The Veterinary Journal** 182:402–411
- Beausoleil NJ, Mellor DJ (2015) Introducing breathlessness as a significant animal welfare issue. **The New Zealand Veterinary Journal** 63(1):44–51
- Belch A, Matiasovic M, Rasotto R, Demetriou J (2017) Comparison of the use of Ligasure versus a standard technique for tonsillectomy in dogs. **Veterinary Record** 180(8)
- Bernaerts F, Talavera J, Leemans J, Hamaide A, Claeys S, Kirschvink N, Clercx C (2010) Description of original endoscopic findings and respiratory functional assessment using barometric whole-body plethysmography in dogs suffering from brachycephalic airway obstruction syndrome. **The Veterinary Journal** 183:95–102
- Bota S, Sporea I, Sirli R, Popescu A, Danila M, Sendroiu M, Focsa M (2010) Spleen assessment by acoustic radiation force impulse elastography (ARFI) for prediction of liver cirrhosis and portal hypertension. **Medical Ultrasonography Journal** 12(3):213-217
- Bowlit K, Moore AH (2009) Surgery of the upper respiratory tract Part 2: Brachycephalic obstructive airway syndrome (BOAS). **Companion Animal** 14(8):19-26
- Bozkuş F, Dikmen N, Samur A, Bilal N, Atilla N, Arpağ H. (2018) Does the neutrophil-to-lymphocyte ratio have any importance between subjects with obstructive sleep apnea syndrome with obesity and without obesity? **Tuberk. Toraks** 66, 8–15
- Calvin AD, Somers VK, Steensma DP, Rio APJ, Van Der Walt C, Fitz-Gibbon MJ, Scott GC, Olson L.J (2010) Advanced heart failure and nocturnal hypoxaemia due to central sleep apnoea are associated with increased serum erythropoietin. **European Journal of Heart Failure** 12:354–359

Campos GM, Bambha , Vittinghoff E, Rabl C, Posselt AM, Ciovica R, Tiwari U, Ferrel L, Pabst M, Bass NM, Merriman RB (2008) A clinical scoring system for predicting nonalcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. **Hepatology** 47(6):1916-1923

Cañas T, Maciá A, Muñoz-Codoceo RA, Fontanilla T, González-Rios P, Miralles M, Gómez-Mardones G (2015) Hepatic and Splenic Acoustic Radiation Force Impulse Shear Wave Velocity Elastography in Children with Liver Disease Associated with Cystic Fibrosis. **Biomed Research International** 1–7

Cantatore M, Gobbetti M, Romussi S, Brambilla G, Giudice C, Grieco V, Stefanello D (2012) Medium term endoscopic assessment of the surgical outcome following laryngeal saccule resection in brachycephalic dogs. **Veterinary Record** 170:518

Chou TC, Liang WM, Wang CB, Wu TN, Hang LW (2015) Obstructive sleep apnea is associated with liver disease: a population-based cohort study. **Sleep Medicine** 16(8):955–60

Corey KE, Misdraji J, Gelrud L, King LY, Zheng H, Malhotra A, Chung RT (2015) Obstructive sleep apnea is associated with nonalcoholic steatohepatitis and advanced liver histology. **Digestive diseases and sciences** 60(8):2523-2528

Crane C, Rozanski EA, Abelson AL, Delaforcade A (2017) Severe brachycephalic obstructive airway syndrome is associated with hypercoagulability in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 1-4

Daltro C, Cotrim HP, Alves E, De Freitas LA, Araújo L, Boente L, Leal R, Portugal T (2010) Nonalcoholic fatty liver disease associated with obstructive sleep apnea: just a coincidence? **Obesity surgery** 20(11):1536-1543

Doust R, Sullivan M (2003) Nasal discharge, sneezing and reverse sneezing. In: KING, L.G. **Textbook of Respiratory Disease in Dogs and Cats**. Saunders Elsevier, St. Louis, 19–26

Drager LF, Li J, Reinke C, Bevans-Fonti S, Jun JC, Polotsky VY (2011) Intermittent hypoxia exacerbates metabolic effects of diet-induced obesity. **Obesity** 19:2167-74

Drager LF, Togeiro SM, Polotsky VY, Lorenzi-Filho G (2013) Obstructive sleep apnea. **Journal of the American College of Cardiology** 62(7):569-576

Dudea SM, Giurgiu CR, Dumitriu D, Chiorean A, Ciurea A, Coman I (2011) Value of ultrasound elastography in the diagnosis and management of prostate carcinoma. **Medical Ultrasonography** 13:45-53

Dulisch M (2003) The Tonsils. In: Slatter D. **Textbook of Small Animal Surgery**. 3 ed. Philadelphia, Saunders 1079-1083

Dupré G, Findji L, Oechtering G (2012) Brachycephalic airway syndrome. In: Monnet E. **Small animal soft tissue surgery**. Ames, Wiley-Blackwell 167–83

Dupré G, Heidenreich D (2016) Brachycephalic syndrome. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 46(4):691-707

Eiler J, Kleinholdermann U, Albers D, Dahms J, Hermann F, Behrens C, Luedemann M, Klingmueller V, Alzen GFP (2012) Standard value of ultrasound elastography using acoustic radiation force impulse imaging (ARFI) in healthy liver tissue of children and adolescents. **Ultraschall der Medizin** 33:474–479

Fawcett A, Barrs V, Awad M, Child G, Brunel L, Mooney E, Martinez-Taboada F, McDonald B, McGreevy P (2019) Consequences and Management of Canine Brachycephaly in Veterinary Practice: Perspectives from Australian Veterinarians and Veterinary Specialists. **Animals** 9(3):1-25

Feliciano MAR, Muzzi LAL, Leite CAL, Junqueira MA (2007) Two-dimensional conventional, high resolution two-dimensional and three-dimensional ultrasonography in the evaluation of pregnant bitch. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences** 59:1333-1337

Feliciano MAR, Maronezi MC, Pavan L, Castanheira TL, Simões APR, Carvalho CF, Canola JC, Vicente WRR (2014) ARFI elastography as complementary diagnostic method of mammary neoplasm in female dogs – preliminary results. **Journal of Small Animal Practice** 55:504-508

Feng YH, Hu XD, Zhai L, Liu JB, Qiu LY, Zu Y, Liang S, Gui Y, Qian LX (2016) Shear wave elastography results correlate with liver fibrosis histology and liver function reserve. **World journal of gastroenterology** 22(17):4338

Flemons WW, Buysse D, Redline S, Oack A, Strohl K, Wheatley J, Young T, Douglas N, Levy P, McNicolas W, Fleetham J, White D, Schmidt-Nowarra W, Carley D, Romaniuk J. (1999). Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. **Sleep** 22(5):667-689.

Friedrich-Rust M, Nierhoff J, Lupsor M, Sporea I, Fierbinteanu-Braticevici C, Strobel D, Takahashi H, Yoneda M, Suda T, Zeuzem S, Herrmann E (2012) Performance of Acoustic Radiation Force Impulse imaging for the staging of liver fibrosis: A pooled meta-analysis. **Journal of Viral Hepatitis** 19:212–219

Friedrich-Rust M, Schlueter N, Smaczny C, Eickmeier O, Rosewich M, Feifel K, Herrmann E, Poynard T, Gleiber W, Lais C, Zielen S, Wagner TOF, Zeuzem S, Bojunga J (2013) Non-invasive measurement of liver and pancreas fibrosis in patients with cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis** 12:431–439

Friedrich-Rust M, Wunder K, Kriener S, Sotoudeh F, Richter S, Bojunga J, Herrmann E, Poynard T, Dietrich CF, Vermehren J, Zeuzem S, Sarrazin C (2009) Liver fibrosis in viral hepatitis: noninvasive assessment with acoustic radiation force impulse imaging versus transient elastography. **Radiology** 252(2):595-604

Gallotti A, D'Onofrio M, Pozzi Mucelli R (2010) Acoustic radiation force impulse (ARFI) technique in ultrasound with virtual touch tissue quantification of the upper abdomen. **La Radiologia Medica** 115:889-897

Gao J, Ran HT, Ye XP, Zheng YY, Zhang DZ, Wang ZG (2012) The stiffness of the liver and spleen on ARFI Imaging pre and post TIPS placement: a preliminary observation. **Clinical Imaging** 36:135-141

Gebo KA, Herlong HF, Torbenson MS, Jenckes MW, Chander G, Ghanem KG, El-Kamary SS, Sulkowski M, Bass EB (2002) Role of liver biopsy in management of chronic hepatitis C: a systematic review. **Hepatology** 36

Gianella P, Caccamo R, Bellino C, Bottero E, Fietta F, Roncone S, Ostanello F, Pietra M, Buracco P. (2019) Evaluation of metabolic profile and C-reactive protein concentrations in brachycephalic dogs with upper airway obstructive syndrome. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 33, 2183–2192

Gibbs C (1981) Radiological features of liver diseases in dogs and cats. **Veterinary Annual** 21:239-249

Grgurevic I, Cikara I, Horvat J, Lukic IK, Heinzl R, Banic M, Kujundzic, M Brkljacic B (2011) Noninvasive assessment of liver fibrosis with acoustic radiation force impulse imaging: increased liver and splenic stiffness in patients with liver fibrosis and cirrhosis. **Ultraschall in der Medizin-European Journal of Ultrasound** 32(02):160-166

Haimel G, Dupré G (2015) Brachycephalic airway syndrome: a comparative study between pugs and French bulldogs. **Journal of Small Animal Practice** 56(12):714-719

Han JY, Cho JH, Kwon HJ, Nam KJ (2012) Predicting portal hypertension as assessed by acoustic radiation force impulse: correlations with the Doppler ultrasound. **The British journal of radiology** 85(1016):e404-e409

Hanquinet S, Courvoisier D, Kanavaki A, Dhoub A, Anooshiravani M (2013a) Acoustic radiation force impulse imaging - Normal values of liver stiffness in healthy children. **Pediatric Radiology** 43:539–544

Hanquinet S, Rougemont AL, Courvoisier D, Rubbia-Brandt L, McLin V, Tempia M, Anooshiravani M (2013b) Acoustic radiation force impulse (ARFI) elastography for the noninvasive diagnosis of liver fibrosis in children. **Pediatric Radiology** 43:545–551

Hendricks JC (1992) Brachycephalic airway syndrome. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 22:1145–53

Hendricks JC (2004) Brachycephalic airway syndrome. In: KING, L.G. **Textbook of Respiratory Diseases in Dogs and Cats**. Saunders Elsevier, St. Louis, 310–318

Hendricks JC, Kline LR, Kovalski RJ, O'Brien JA, Morrison AR, Pack AI (1987). The English bulldog: a natural model of sleep-disordered breathing. **Journal of Applied Physiology**, 63(4), 1344-1350

Hinkle, D. E.; Wiersma, W.; Jurs, S. G (2003) Rule of thumb for interpreting the size of a correlation coefficient. **Applied Statistics for the Behavioral Sciences**. 5th ed. Boston: Houghton Mifflin, p. 108-110

Hoareau GL, Jourdan G, Mellema M, Verwaerde P (2012) Evaluation of arterial blood gases and arterial blood pressures in brachycephalic dogs. **Journal of veterinary internal medicine** 26(4):897-904

Hobson H (1995) Brachycephalic syndrome. **Seminars in veterinary medicine and surgery (Small Animal)** 10:109-114

Hodgson N, Llewellyn EA, Schaeffer D (2018) Utility and Prognostic Significance of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Dogs with Septic Peritonitis. **Journal of American Animal Hospitals Association** 54, 351–359

Holdsworth A, Bradley K, Birch S, Browne WJ, Barberet V (2014) Elastography of the normal canine liver, spleen and kidneys. **Veterinary Radiology & Ultrasound** 55(6):620-627

Huck JL, Stanley BJ, Hauptman JG (2008) Technique and Outcome of Nares Amputation (Trader's Technique) in Immature Shih Tzus. **Journal of the American Animal Hospital Association** 44:82-85.

Iwakiri Y, Groszmann RJ (2006) The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. **Hepatology** 43:S121–S131

Jeon S, Lee G, Lee SK, Kim H, Yu D, Choi J (2015) Ultrasonographic elastography of the liver, spleen, kidneys, and prostate in clinically normal beagle dogs. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, 56(4):425-431

Jouët P, Sabaté JM, Maillard D, Msika S, Mechler C, Ledoux S, Harnois F, Coffin B (2007) Relationship between obstructive sleep apnea and liver abnormalities in morbidly obese patients: a prospective study. **Obesity surgery** 17(4):478

Kallwitz ER, Herdegen J, Madura J, Jakate S, Cotler SJ (2007) Liver enzymes and histology in obese patients with obstructive sleep apnea. **Journal of clinical gastroenterology** 41(10):918-921

Kamble R, Sodhi KS, Thapa BR, Saxena AK, Bhatia A, Dayal D, Khandelwal N (2017) Liver acoustic radiation force impulse (ARFI) in childhood obesity: comparison and correlation with biochemical markers. **Journal of Ultrasound in Medicine** 20:33–42

Koch DA, Arnold S, Hubler M, Montavon P (2003) Brachycephalic syndrome in dogs. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian - North Am Edition** 25(1):48–55

Lawrence YA, Steiner JM (2017) Laboratory Evaluation of the Liver. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 47:539–553

Lee MJ, Kim MJ, Han KH, Yoon CS (2013) Age-related changes in liver, kidney, and spleen stiffness in healthy children measured with acoustic radiation force impulse imaging. **European Journal of Radiology** 82:e290–e294

Lidbury J.A. (2017) Getting the Most Out of Liver Biopsy. **Veterinary Clinicians North America - Small Animal Practice** 47, 569–583

Lilja-Maula L, Lappalainen AK, Hyytiäinen HK, Kuusela E, Kaimio M, Schildt K, Mölsä S, Morelius M, Rajamäki MM (2017) Comparison of submaximal exercise test results and severity of brachycephalic obstructive airway syndrome in English bulldogs. **The Veterinary Journal** 219:22-26

Lin QC, Chen LD, Chen GP, Zhao JM, Chen X, Huang JF, Wu LH (2015) Association between nocturnal hypoxia and liver injury in the setting of nonalcoholic fatty liver disease. **Sleep and Breathing** 19(1):273-280

Lisa R, Romussi S, Garcia P, Albertini M, Vara E, Sánchez de la Muela M (2013) Assessment of circulating concentrations of proinflammatory & anti-inflammatory cytokines & NO in dogs w/ BAOS. **American Journal of Veterinary Research** 74:155–160

Liu NC, Adams VJ, Kalmar L, Ladlow JF, Sargan DR (2016) Whole-Body Barometric Plethysmography Characterizes Upper Airway Obstruction in 3 Brachycephalic Breeds of Dogs. **Journal of veterinary internal medicine** 30(3):853-865

Liu NC, Genain MA, Kalmar L, Sargan DR, Ladlow JF (2019) Objective effectiveness of and indications for laser-assisted turbinectomy in brachycephalic obstructive airway syndrome. **Veterinary Surgery** 48(1):79-87

Liu NC, Oechtering GU, Adams VJ, Kalmar L, Sargan DR, Ladlow JF (2017) Outcomes and prognostic factors of surgical treatments for brachycephalic obstructive airway syndrome in 3 breeds. **Veterinary Surgery** 46(2):271-280

Liu NC, Sargan DR, Adams VJ, Ladlow JF, (2015) Characterisation of brachycephalic obstructive airway syndrome in French bulldogs using whole-body barometric plethysmography. **PLoS One** 10

Liu NC, Troconis EL, Kalmar L, Price DJ, Wright HE, Adams VJ, Sargan DR, Ladlow JF, (2017) Conformational risk factors of brachycephalic obstructive airway syndrome (BOAS) in pugs, French bulldogs, and bulldogs. **PLoS One** 12:1–24

Lodato DL, Hedlund CS (2012) Brachycephalic airway syndrome: pathophysiology and diagnosis. **Compendium (Yardley, PA)** 34(7):E3-E3

Marolf AJ (2017) Diagnostic Imaging of the Hepatobiliary System: An Update. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 47(3):555-568

Maronezi MC, Feliciano MAR, Crivellenti LZ, Simões APR, Bartlewski PM, Gill I, Canola JCC, Vicente WRR (2015) Acoustic radiation force impulse elastography of the spleen in healthy dogs of different ages. **Journal of Small Animal Practice** 56(6):393-397

Matos H, Trindade A, Noruegas MJ, (2014) Acoustic radiation force impulse imaging in paediatric patients: Normal liver values. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition** 59: 684–688

Meola SD (2013) Brachycephalic airway syndrome. **Topics in companion animal medicine** 28(3):91-96

Nagaraju K, Raben N, Merritt G, Loeffler L, Kirk K, Plotz P (1998) A variety of cytokines and immunologically relevant surface molecules are expressed by normal human skeletal muscle cells under proinflammatory stimuli. **Clinical and Experimental Immunology** 113:407- 414

Nedredal GI, Yin M, McKenzie T, Lillegard J, Luebke-Wheeler J, Talwalkar J, Ehman R, Nyberg SL (2011) Portal hypertension correlates with splenic stiffness as measured with MR elastography. **Journal of Magnetic Resonance Imaging** 34(1):79-87

Njikam IN, Huault M, Pirson V, Detilleux J (2009) The Influence of Phylogenetic Origin on the Occurrence of Brachycephalic Airway Obstruction Syndrome in a Large Retrospective Study. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine** 7:138–143

Nobili V, Cutrera R, Liccardo D, Pavone M, Devito R, Giorgio V, Verrillo E, Baviera G, Musso G (2014) Obstructive sleep apnea syndrome affects liver histology and inflammatory cell activation in pediatric nonalcoholic fatty liver disease, regardless of obesity/insulin resistance. **American journal of respiratory and critical care medicine** 189(1):66-76

O'Neill DG, Jackson C, Guy JH, Church DB, McGreevy PD, Thomson PC, Brodbelt DC (2015) Epidemiological associations between brachycephaly and upper respiratory tract disorders in dogs attending veterinary practices in England. **Canine Genetics and Epidemiology** 2(1):10

Oechtering G, Schuenemann R (2010) Brachycephalics: trapped in a man-made misery? Turbinate Ablation in BAOS. In: **Proceedings of Association of Veterinary Soft Tissue Surgeons Autumn Scientific Meetings**; Cambridge, UK, 28-32

Oechtering G (2010) Brachycephalic syndrome – new information on an old congenital disease. **Veterinary Record** 20:2-9

Oechtering GU, Pohl S, Schlueter C, Schuenemann R (2016) A novel approach to brachycephalic syndrome. 2. Laser-assisted turbinectomy (LATE). **Veterinary Surgery** 45:173-181

Packer RMA, Hendricks A, Tivers MS, Burn CC (2015) Impact of facial conformation on canine health: brachycephalic obstructive airway syndrome. **PLoS One** (10):1-21

Packer RMA, Hendricks A, Burn CC (2012) Do dog owners perceive the clinical signs related to conformational inherited disorders as “normal” for the breed? A potential constraint to improving canine welfare. **Animal Welfare** 21(1):81–93

Packer RMA, Tivers MS (2015) Strategies for the management and prevention of conformation-related respiratory disorders in brachycephalic dogs. **Veterinary Medicine: Research and Reports** 6:219–232

Parati G, Ochoa JE, Bilo G, Mattaliano P, Salvi P, Kario K, Lombardi C (2014) Obstructive sleep apnea syndrome as a cause of resistant hypertension. **Hypertension Research** 37:601–613

Petrof BJ, Hendricks JC, Pack AI (1996) Does upper airway muscle injury trigger a vicious cycle in obstructive sleep apnea? A hypothesis. **Sleep** 19:465-471

Phelps A, Ramachandran R, Courtier J, Perito E, Rosenthal P, MacKenzie JD (2017) Ultrasound elastography: is there a shear wave speed cut off for pediatric liver fibrosis and inflammation? **Clinical Imaging** 41:95–100

Pichetto M, Silvana A, Roccabianca P, Romussi S (2011) The Anatomy of the Dog Soft Palate II. Histologia Evaluation of the Caudal Soft Palate in Brachycephalic Breeds With Grade I Brachycephalic Airway Obstructive Syndrome. **The Anatomical Record** 294:1267-1272

Picó Aliaga SD, Muro Velilla D, García-Martí G, Sangüesa Nebot C, Martí-Bonmatí L, (2015) La elastografía mediante técnica Acoustic radiation force impulse es eficaz en la detección de fibrosis hepática en el niño. **Radiología** 57:314–320

Pierini, A, Gori E, Lippi I, Ceccherini G, Lubas G, Marchetti V. (2019) Neutrophil-to-lymphocyte ratio, nucleated red blood cells and erythrocyte abnormalities in canine systemic inflammatory response syndrome. **Research Veterinary Science** 126, 150–154

Pohl S, Roedler FS, Oechtering GU (2016) How does multilevel upper airway surgery influence the lives of dogs with severe brachycephaly? Results of a structured pre-and postoperative owner questionnaire. **The Veterinary Journal** 210:39-45

Polotsky VY, Patil SP, Savransky V, Laffan A, Fonti S, Frame LA, Steele KE, Schweitzer MA, Clark JM, Torbenson MS, Schwartz AR (2009) Obstructive sleep apnea, insulin resistance, and steatohepatitis in severe obesity. **American journal of respiratory and critical care medicine** 179(3):228-234

Poncet CM, Dupre GP, Freiche VG, Estrada MM, Poubanne YA, Bouvy BM (2005) Prevalence of gastrointestinal tract lesions in 73 brachycephalic dogs with upper respiratory syndrome. **Journal of small animal practice** 46(6):273-279

Pratschke K (2014) Current thinking about brachycephalic syndrome: More than just airways. **Companion Animal** 19:70–78

Pulixi EA, Tobaldini E, Battezzati PM, D'Ingianna P, Borroni V, Fracanzani AL, Maggioni M, Pelusi S, Bukgheroni M, Zuin M, Fargion S, Montano N, Valenti L (2014) Risk of obstructive sleep apnea with daytime sleepiness is associated with liver damage in non-morbidly obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. **PLoS One** 9(4):e96349

Qi JC, Huang JC, Lin QC, Zhao JM, Lin X, Chen LD, Huang JF, Chen X (2016) Relationship between obstructive sleep apnea and nonalcoholic fatty liver disease in nonobese adults. **Sleep and Breathing** 20(2):529-535

Rancan L, Romussi S, Garcia P, Albertini M, Vara E, De La Muela MS (2013) Assessment of circulating concentrations of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines and nitric oxide in dogs with brachycephalic airway obstruction syndrome. **American journal of veterinary research** 74(1):155-160

Raghu C, Ekena J, Cullen JM, Webb CB, Trepanier LA, (2018) Evaluation of potential serum biomarkers of hepatic fibrosis and necroinflammatory activity in dogs with liver disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 32:1009–1018

Riecks TW, Birchard SJ, Stephens JA (2007) Surgical correction of brachycephalic syndrome in dogs: 62 cases (1991–2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 230:1324–1328

Riggs J, Liu NC, Sutton DR, Sargan D, Ladlow JF (2019) Validation of exercise testing and laryngeal auscultation for grading brachycephalic obstructive airway syndrome in pugs, French bulldogs, and English bulldogs by using whole-body barometric plethysmography. **Veterinary Surgery** 1-9

Rivero-Juárez A, Morgaz J, Camacho A, Muñoz-Rascó P, Dominguez JM, Sánchez-Céspedes R, Torre-Cisneros J, Rivero A (2012) Liver stiffness using transient elastography is applicable to canines for hepatic disease models. **PLoS ONE** 7:1-4

Roedler FS, Pohl S, Oechtering GU (2013) How does severe brachycephaly affect dog's lives? Results of a structured preoperative owner questionnaire. **The Veterinary Journal** 198(3):606–10

Rotemberg V, Byram B, Palmeri M, Wang M, Nightingale K (2013) Ultrasonic characterization of the nonlinear properties of canine livers by measuring shear wave speed and axial strain with increasing portal venous pressure. **Journal of biomechanics** 46(11):1875-1881

Salciccioli JD, Marshall DC, Pimentel MAF, Santos MD, Pollard T, Celi AA, Shalhoub J, (2015) The association between the neutrophil-to-lymphocyte ratio and mortality in critical illness: An observational cohort study. **Critical Care** 19, 1–8

Sanyal AJ, Bosch J, Blei A, Arroyo V (2008) Portal hypertension and its complications. **Gastroenterology** 134:1715–1728

Sekosan M, Zakkar M, Wenig BL, Olopade CO, Rubinstein I (1996) Inflammation in the uvula mucosa of patients with obstructive sleep apnea. **Laryngoscope** 106:1018-1020.

Silva P, Uscategui RAR, Maronezi MC, Gasser B, Pavan L, Gatto IRH, de Almeida VT, Vicente WRR, Feliciano MAR (2018) Ultrasonography for lymph nodes metastasis identification in bitches with mammary neoplasms. **Scientific Reports** 8:1–8

Son CY, Kim SU, Han WK, Choi, G. H., Park, H., Yang, S. C., Choi JS, Park JY, Kim DY, Ahn SH, Chon CY, Han KW (2012) Normal liver elasticity values using acoustic radiation force impulse imaging: a prospective study in healthy living liver and kidney donors. **Journal of Gastroenterology and Hepatology** 27(1):130–6

Sporea I, Şirli R, Popescu A, Bota S, Badea R, Lupşor M (2011) Is it better to use two elastographic methods for liver fibrosis assessment? **World Journal of Gastroenterology** 17:3824–3829

Sporea I, Sirli R, Popescu A, Danila M (2010) Acoustic radiation force impulse (ARFI)—a new modality for the evaluation of liver fibrosis. **Medical Ultrasonography** 12:26–31

Stockham SL, Scott MA (2011) Função hepática. In: Stockham SL, Scott MA. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2 ed, 562-588

Sundaram SS, Sokol RJ, Capocelli KE, Pan Z, Sullivan JS, Robbins K, Halbower AC (2014) Obstructive sleep apnea and hypoxemia are associated with advanced liver histology in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of pediatrics** 164(4):699-706

Tamura M, Ohta H, Shimbo G, Osuga T, Sasaki N, Morishita K, Kagawa Y, Takiguchi M. (2019). Usefulness of noninvasive shear wave elastography for the assessment of hepatic fibrosis in dogs with hepatic disease. **Journal Of Veterinary Internal Medicine**, 33(5), 2067-2074

Tanné F, Gagnadoux F, Chazouilleres O, Fleury B, Wendum D, Lasnier E, Lebeau B, Poupon R, Serfaty L (2005) Chronic liver injury during obstructive sleep apnea. **Hepatology** 41(6):1290-1296

The Kennel Club. UK: Dog breeds-registration statistics in the UK, 2009–2018. Available at: <http://www.thekennelclub.org.uk/registration/breed-registration-statistics/>. Acessado em setembro de 2019

Torrez CV, Hunt GB (2006) Results of surgical correction of abnormalities associated with brachycephalic airway obstruction syndrome in dogs in Australia. **Journal of Small Animal Practice** 47:150–4

Trzepizur W, Boursier J, Le Vaillant M, Ducluzeau PH, Dubois S, Henni S, Abraham P, Aubé C, Calès P, Gagnadoux F, (2018) Increased liver stiffness in patients with severe sleep apnoea and metabolic comorbidities. **European Respiratory Journal** 51

White J, Gay J, Farnsworth R, Mickas M, Kim K, Mattoon, J (2014) Ultrasound elastography of the liver, spleen, and kidneys in clinically normal cats. **Veterinary Radiology & Ultrasound** 55(4):428–34

Ye, X. P., Ran, H. T., Cheng, J. Zhu YF, Zhang DZ, Zhang P, Zheng YY (2012) Liver and spleen stiffness measured by acoustic radiation force impulse elastography for noninvasive assessment of liver fibrosis and esophageal varices in patients with chronic hepatitis B. **Journal of Ultrasound in Medicine** 31(8):1245-1253

Yenigun A, Karamanli H, (2015) Investigation of the relationship between neutrophil-to-lymphocyte ratio and obstructive sleep apnoea syndrome. **Journal of Laryngology Otology** 129, 887–892

9. APÊNDICE A

Tabela A1. Resultados da análise de variâncias ANOVA dos parâmetros obtidos por meio de hemograma e bioquímica sérica (média $\pm$ desvio padrão) comparados entre as raças estudadas e entre gêneros. Jaboticabal, 2019.

Hemograma	Raça			
	Bulldog Francês	Pug	Beagle	
Hemácias (uL)	6.990.000 $\pm$ 604.141 ^{ab}	6.822.353 $\pm$ 448.101 ^a	7.298.636 $\pm$ 433.802 ^b	0,016*
Hemoglobina (g/dL)	18,40 $\pm$ 1,70 ^b	17,21 $\pm$ 1,12 ^a	18,12 $\pm$ 1,15 ^{ab}	0,025*
Hematócrito (%)	51,54 $\pm$ 4,57 ^b	48,47 $\pm$ 3,42 ^a	51,53 $\pm$ 3,42 ^b	0,029*
Plaquetas (10 ³ /uL)	423.968 $\pm$ 136.507	457.118 $\pm$ 118.082	387.682 $\pm$ 143.212	0,172
Leucócitos (10 ³ /uL)	9861 $\pm$ 1809 ^b	12876 $\pm$ 2954 ^a	8610 $\pm$ 1997 ^b	<0,001***
Bioquímica sérica				
AST(uL)	28,56 $\pm$ 7,98	27,64 $\pm$ 12,60	27,64 $\pm$ 12,60	0,065
ALT (uL)	29,46 $\pm$ 12,34 ^a	28,00 $\pm$ 9,40 ^a	44,35 $\pm$ 11,74 ^b	<0,001***
BT (mg/dL)	0,18 $\pm$ 0,11 ^a	0,23 $\pm$ 0,18 ^{ab}	0,31 $\pm$ 0,12 ^b	0,001**
BD (mg/dL)	0,11 $\pm$ 0,14	0,08 $\pm$ 0,06	0,08 $\pm$ 0,06	0,686
Proteína total (g/dL)	8,10 $\pm$ 1,97	9,34 $\pm$ 1,38	7,8 $\pm$ 2,40	0,057
Albumina (g/dL)	3,21 $\pm$ 0,84	3,30 $\pm$ 0,80	3,44 $\pm$ 0,66	0,547
Hemograma	Gênero			
	Fêmea	Macho		
Hemácias (uL)	7.078.837 $\pm$ 577.42	6.994.444 $\pm$ 493.96		0,531
Hemoglobina (g/dL)	18,16 $\pm$ 1,42	17,85 $\pm$ 1,56		0,342
Hematócrito (%)	50,90 $\pm$ 4,32	50,59 $\pm$ 4,14		0,765
Plaquetas (10 ³ /uL)	449.070 $\pm$ 132.910	375.290 $\pm$ 128.220		0,011*
Leucócitos (10 ³ /uL)	10,21 $\pm$ 2,50	9,97 $\pm$ 3,03		0,574
Bioquímica sérica				
AST(uL)	28,13 $\pm$ 7,42	32,36 $\pm$ 11,50		0,107
ALT (uL)	31,47 $\pm$ 13,78	37,47 $\pm$ 12,25		0,068
BT (mg/dL)	0,23 $\pm$ 0,12	0,23 $\pm$ 0,11		0,928
BD (mg/dL)	0,07 $\pm$ 0,12	0,08 $\pm$ 0,11		0,462
Proteína total (g/dL)	8,34 $\pm$ 2,05	8,31 $\pm$ 2,09		0,950
Albumina (g/dL)	3,35 $\pm$ 0,77	3,24 $\pm$ 0,79		0,576

Diferenças significativas obtidas pelo teste de análise de variâncias (ANOVA) com níveis de significância em $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$ e $p < 0.001^{***}$. Linhas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si. AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; BT: bilirrubina total, BD: bilirrubina direta.

Tabela A2. Análise de variâncias ANOVA dos parâmetros de hemograma e bioquímica sérica (média $\pm$ desvio padrão) entre os graus de síndrome braquicefálica e graus de estenose de narina. Jaboticabal, 2019.

Hemograma	Grau da síndrome braquicefálica				Valor de p*
	0	I	II	III	
Hemácias (uL)	7.233.939 $\pm$ 494.848	6.680.000 $\pm$ 502.925	6.996.154 $\pm$ 574.058	6.975.455 $\pm$ 514.400	0,267
Hemoglobina (g/dL)	18,26 $\pm$ 1,33	17,21 $\pm$ 1,60	18,06 $\pm$ 1,58	18,24 $\pm$ 1,48	0,219
Hematócrito (%)	52,11 $\pm$ 3,47	48,13 $\pm$ 4,18	50,23 $\pm$ 5,31	51,75 $\pm$ 4,06	0,119
Plaquetas (10 ³ /uL)	426.727 $\pm$ 146.169	457.769 $\pm$ 154.427	447.000 $\pm$ 111.152	405.272 $\pm$ 99.440	0,781
Leucócitos (10 ³ /uL)	9836 $\pm$ 1991	10900 $\pm$ 3428	11338 $\pm$ 2025	11063 $\pm$ 3358	0,586
Bioquímica sérica					
AST(uL)	28,09 $\pm$ 7,64	23,77 $\pm$ 5,5	30,18 $\pm$ 10,33	31,33 $\pm$ 13,97	0,228
ALT (uL)	25,39 $\pm$ 13,88	25,38 $\pm$ 9,04	30,21 $\pm$ 14,53	35,17 $\pm$ 10,49	0,113
BT (mg/dL)	0,16 $\pm$ 0,13	0,17 $\pm$ 0,07	0,26 $\pm$ 0,22	0,20 $\pm$ 0,12	0,669
BD (mg/dL)	0,11 $\pm$ 0,12	0,13 $\pm$ 0,17	0,08 $\pm$ 0,07	0,07 $\pm$ 0,08	0,134
Proteína total (g/dL)	8,34 $\pm$ 2,21	8,50 $\pm$ 2,02	8,94 $\pm$ 1,66	8,32 $\pm$ 2,12	0,842
Albumina (g/dL)	2,28 $\pm$ 0,69 ^{ab}	2,16 $\pm$ 0,38 ^{ab}	2,28 $\pm$ 0,94 ^a	1,90 $\pm$ 1,9 ^b	0,040*
Grau da estenose de narina					
Hemograma	A	DE	ME	SE	
Hemácias (uL)	7.351.154 $\pm$ 456.468 ^a	6.841.579 $\pm$ 497.452 ^b	6.966.000 $\pm$ 586.805 ^{ab}	6.763.000 $\pm$ 455.803 ^b	0,041*
Hemoglobina (g/dL)	19,55 $\pm$ 1,31	17,64 $\pm$ 1,61	17,92 $\pm$ 1,62	18,09 $\pm$ 1,42	0,206
Hematócrito (%)	55,85 $\pm$ 3,62	49,43 $\pm$ 4,08	50,72 $\pm$ 4,28	49,79 $\pm$ 5,30	0,071
Plaquetas (10 ³ /uL)	520.000 $\pm$ 152.755	430.421 $\pm$ 153.266	415.266 $\pm$ 100.419	442.700 $\pm$ 105.979	0,562
Leucócitos (10 ³ /uL)	11,00 $\pm$ 2,05	10,82 $\pm$ 3,05	11,1 $\pm$ 3,08	10,28 $\pm$ 2,15	0,916
Bioquímica sérica					
AST(uL)	31,43 $\pm$ 7,19	26,13 $\pm$ 12,27	30,03 $\pm$ 9,59	28,23 $\pm$ 5,15	0,253
ALT (uL)	30,12 $\pm$ 12,09	26,24 $\pm$ 8,81	33,87 $\pm$ 11,00	26,19 $\pm$ 15,81	0,207
BT (mg/dL)	0,13 $\pm$ 0,13	0,15 $\pm$ 0,05	0,25 $\pm$ 0,15	0,26 $\pm$ 0,21	0,130
BD (mg/dL)	0,05 $\pm$ 0,14	0,13 $\pm$ 0,15	0,08 $\pm$ 0,07	0,10 $\pm$ 0,08	0,366
Proteína total (g/dL)	8,36 $\pm$ 2,27	8,59 $\pm$ 1,73	8,82 $\pm$ 1,84	8,10 $\pm$ 2,41	0,824
Albumina (g/dL)	3,42 $\pm$ 0,69	3,39 $\pm$ 0,67	3,11 $\pm$ 1,06	3,09 $\pm$ 0,66	0,639

Diferenças significativas obtidas pelo teste de análise de variâncias (ANOVA) com níveis de significância em $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$ e $p < 0.001^{***}$. Linhas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si. EN: estenose de narina (A: abertas, DE: discretamente estenóticas, ME: moderadamente estenóticas, SE: severamente estenóticas); AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; BT: bilirrubina total, BD: bilirrubina direta.

10. APÊNDICE B

Valores de referência de hemograma e bioquímica sérica do laboratório de patologia clínica do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel – FCAV – Unesp Câmpus Jaboticabal

Parâmetros	Valores de referência
Hemácias	5,5 - 8,5 x 10 ⁶ uL
Hemoglobina	10 – 18 g/dL
Hematócrito	37 -55 %
Plaquetas	180 - 400 x 10 ³ uL
Leucócitos	6 -18 x 10 ³ uL
AST	10,0- 88 uL
ALT	10,0- 88 uL
Bilirrubina total	0,01 - 0,5 mg/dL
Bilirrubina direta	0,06 - 0,2 mg/dL
Proteínas totais	5,8 - 7,9 g/dL
Albumina	2,6 - 4,0 g/dL

uL: microlitro, mg/dL: micrograma por decilitro, g/dL: grama por decilitro, %: porcentagem

AST: aspartato aminotransferase

ALT: alanina aminotransferase

11. APÊNDICE C

MODELO TERMO DE CONSENTIMENTO

Título do projeto: Elastografia ARFI dos tecidos hepático e esplênico de pacientes caninos afetados pela síndrome braquicefálica

Nome do pesquisador principal: Paola Castro Moraes

Objetivos do estudo: Definir medidas de elastografia esplênica e hepática em cães braquicefálicos afetados por diferentes graus da síndrome aérea obstrutiva braquicefálica. Avaliação hematológica e bioquímica por coleta de sangue de veia periférica e teste de exercício submáximo, com caminhada de 3 minutos.

Benefícios: Descrever os benefícios do estudo para o animal e, se for o caso, para outros animais que poderão se beneficiar com os resultados do projeto. Se houver algum benefício para a sociedade, o pesquisador também deve mencionar.

Esclarecimentos ao proprietário sobre a participação do animal neste projeto

Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(is) nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(is) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s). A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares. O Médico Veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será Andréia Coutinho Facin, inscrita no CRMV sob o número 38201 -SP. Além dele, a equipe do Pesquisador Principal Paola Castro Moraes também se responsabilizará pelo bem-estar do(s) seu(s) animal(is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos:

Tel. de emergência:

Equipe: Endereço:

Telefone:

Declaração de consentimento

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto. Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

(Jaboticabal/SP), / /2018

Assinatura do Responsável: _____

Nome:

Documento de Identidade:

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____

Identificação do(s) animal(is)

Nome:

Número de identificação:

Espécie:

Raça: