

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

**ULTRASSONOGRAFIA MODO B E
DOPPLERFLUXOMETRIA MATERNO FETAL NA
AVALIAÇÃO GESTACIONAL DE OVELHAS**

**Victor José Correia Santos
Médico Veterinário**

2017

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

**ULTRASSONOGRAFIA MODO B E
DOPPLERFLUXOMETRIA MATERNO FETAL NA
AVALIAÇÃO GESTACIONAL DE OVELHAS**

Victor José Correia Santos

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Coorientador: Prof. Dr. Marcus Antonio Rossi Feliciano

Profa. Dra. Maria Emilia Franco Oliveira

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus
Jaboticabal, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária (Reprodução Animal)**

2017

Santos, Victor José Correia
S237u Ultrassonografia modo b e dopplerfluxometria materno fetal na
avaliação gestacional de ovelhas / Victor José Correia Santos. –
Jaboticabal, 2017
iv, 56 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente

Coorientadores: Marcus Antônio Rossi Feliciano, Maria Emilia
Franco Oliveira

Banca examinadora: Luciana Cristina Padilha Nakaghi, Felipe
Farias Pereira da Câmara Barros, Erika da Silva Carvalho Morani,
Eliandra Antonia Pires Buttler

Bibliografia

1. Ultrassom. 2. Gestação. 3. Desenvolvimento. 4. Ovinos. I. Título.
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-73:636.3



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ULTRASSONOGRAFIA MODO B E DOPPLERFLUXOMETRIA MATERNO FETAL NA AVALIAÇÃO GESTACIONAL DE OVELHAS

AUTOR: VICTOR JOSÉ CORREIA SANTOS

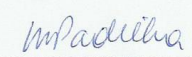
ORIENTADOR: WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE

COORDENADORA: MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA

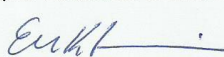
COORDENADOR: MARCUS ANTÔNIO ROSSI FELICIANO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:


Prof Dr WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pós-doutoranda LUCIANA CRISTINA PADILHA NAKAGHI
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. FELIPE FÁRIAS PEREIRA DA CÂMARA BARROS
Hospital Veterinário / UNIFRAN - Franca/SP


Pesquisadora Dra. ERIKA DA SILVA CARVALHO MORANI
INPRENHA / Top in Life Biotecnologia e Genética Animal - Jaboticabal/SP


Pós-doutoranda ELIANDRA ANTONIA PIRES BUTTLER
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 09 de novembro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

VICTOR JOSÉ CORREIA SANTOS – filho de Edilberto do Nascimento Santos e Elza Lilian Cardoso Correia, nasceu em Belém/Pará - Brasil, no dia 04 de março de 1985. Em janeiro de 2012, formou-se como Médico Veterinário na Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém/Pará, Brasil. Estagiou por sete semestres no Centro de Pesquisa em Caprino e Ovinos do Pará nessa mesma faculdade. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica PIBIC/CNPQ, por um semestre. Ainda no último semestre da graduação, foi aprovado no Mestrado pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista pelo programa de Medicina Veterinária/Reprodução Animal sob a orientação de Wilter Ricardo Russiano Vicente. Durante o Mestrado, participou de diversos projetos de pesquisa. Ministrou palestras e aulas em disciplinas da pós-graduação. Ingressou no doutorado na mesma instituição em março de 2014, também sob orientação de Wilter Ricardo Russiano Vicente, tendo ministrado palestras, aulas para a pós-graduação e também para a graduação do curso de Medicina Veterinária na condição de estagiário de docência nas disciplinas “Obstetrícia Veterinária” e “Anatomia dos Animais Domésticos III”.

AGRADECIMENTOS (ERRATA)

Agradeço aos meus pais Elza Correia e Edilberto Santos e irmão Arlindo Santos que sempre me deram todo apoio e todas as condições para que eu me desenvolvesse pessoal e profissionalmente; ensinaram valores que construíram o meu caráter e fizeram de mim o melhor que poderia ser. Também agradeço a Natalina, minha mãe preta, que ajudou meus pais cuidando de mim e que até hoje é minha babá e faz minhas comidas preferidas quando vou à Belém.

Agradeço a todos do Centro de Pesquisa em Caprinos e Ovinos do Pará na figura do professor Luiz Fernando. Todos os que já estavam lá quando iniciei o estágio por tudo que me ensinaram. Conheci o Pedro Paulo quando entrei no CPCOP e até hoje faz o que pode para ajudar os amigos. Obrigado pelas ovelhas. Também foi lá a primeira vez que vi a imagem de um feto no útero, fato que me emocionou naquele dia e continua até hoje.

Agradeço à minha esposa que desde quando éramos noivos, eu morando em Jaboticabal, ela em Belém e até hoje se mostra compreensiva quanto as minhas obrigações acadêmicas. Me deu nosso Davi que é a melhor coisa que poderia ter acontecido em nossas vidas.

Não conseguiria fazer nada sem a ajuda de grandes amigos que conquistei nessa instituição. Professor Wilter sempre ajudando em tudo que pode, trazendo paz e tranquilidade mesmo quando parece que tudo vai dar errado. Marcus, Ricardo e Vívian além da amizade pessoal, por serem também os melhores coorientadores que poderia ter. Não posso esquecer do Time Ovinos: Mariana, Renata, Priscila e Augusto. Se conseguimos executar cinco experimentos com os mesmos animais, foi porque trabalhamos bem juntos, apesar dos momentos de estresse, inevitáveis quando se trabalha tanto e por tanto tempo juntos.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias por proporcionar tudo que precisei para a execução do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão de bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo pela concessão de bolsa de estudo sob protocolo nº 2014/15422-0 e projeto temático nº2017/14957-6.

SUMÁRIO

	Pag.
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	vi
1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.1 Introdução	1
1.4 Revisão de literatura	3
Ultrassonografia gestacional em ovelhas - Revisão de literatura	3
Resumo	3
Abstract.....	4
INTRODUÇÃO.....	4
Ultrassonografia bidimensional - Modo B.....	5
Ultrassonografia “Doppler”	9
Elastografia	11
Considerações finais	12
Agradecimentos.....	13
Referências bibliográficas.....	13
2. CAPÍTULO 2 – Ultrassonografia modo-B e parâmetros ecobiométricos para estudo do desenvolvimento embrionário/fetal em ovinos	17
Resumo	17
Introdução	18
Materiais e métodos.....	19
Análise estatística	21
Resultados	21
Discussão	28
Conclusão.....	32
Agradecimentos.....	33
Referências Bibliográficas.....	33
3. CAPÍTULO 3 - Avaliação dos índices dopperfluxométricos de estruturas materno-fetais em ovelhas gestantes	36
Resumo	36
Introdução	37

Materiais e Métodos	38
Resultados	40
Aorta fetal	41
Ovários esquerdos	42
Ovários direitos.....	44
Artéria uterina.....	45
Placentônios.....	46
Artéria umbilical.....	48
Discussão	49
Conclusão.....	52
Agradecimentos.....	52
Referências Bibliográficas	53
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	56

ULTRASSONOGRAFIA MODO B E DOPPLERFLUXOMETRIA MATERNO FETAL NA AVALIAÇÃO GESTACIONAL DE OVELHAS

RESUMO – O entendimento acerca da fisiologia do processo gestacional e desenvolvimento embrionário/fetal oferece conhecimento para que se tome decisões acertadas em relação ao manejo da fêmea gestante, além destes animais serem utilizados como modelo experimental para a medicina humana, o que reforça a importância do estudo da gestação em ovinos. Nesse contexto, a ultrassonografia se apresenta como melhor opção para avaliar o desenvolvimento da gestação. É uma tecnologia segura que permite que se façam avaliações repetidas durante todo o processo gestacional. Objetivou-se estudar o desenvolvimento fisiológico embrionário/fetal durante a gestação de ovelhas por meio da ultrassonografia a fim de se obter parâmetros de normalidade que possam ser utilizados como referência para o diagnóstico de possíveis alterações do desenvolvimento embrionário/fetal e desenvolver fórmulas para predição de idade gestacional. Foram utilizadas 30 ovelhas Santa Inês pesando $45,4 \pm 4,3$ kg, entre 2 e 5 anos e realizados exames ultrassonográficos semanais desde a 3^a, até a 21^a semana gestacional. Para a análise estatística, realizou-se teste de “Shapiro” para normalidade, com medidas reais ou transformadas correlacionadas com as semanas gestacionais pelo teste de “Spearman”. Quando significativo, foram testados os ajustes dos parâmetros e semanas gestacionais à modelos de regressão. Foi utilizado nível de significância de 5% e os resultados apresentados como média $\pm$ DP (desvio padrão). Foram avaliados os diâmetros da vesícula gestacional (VG), abdominal (DA), torácico (DT), biparietal (DBP), da órbita ocular (OO) e dos placentônios (PL), além dos comprimentos crâniocaudal (CC), da nuca ao focinho (NF), da escápula (ESCA), do úmero (UME), do rádio (RD), do metacarpo (MCAR), do fêmur (FEM), da tíbia (TI), do metatarso (MTAR) e dos rins (RIM); mensuração da frequência cardíaca (FC em bat/min) obtida por meio do “Doppler” Pulsado e as medidas de comprimento da base ao ápice do coração (CCOR) e de largura da parede esquerda à direita na região mais próxima à base (LCOR). Os maiores coeficientes de determinação (R^2) foram obtidos para o diâmetro biparietal foi de 96,5% e para o metacarpo de 93%. O diâmetro abdominal apresentou 91,7% e a largura do coração 90,2%. Estes últimos podem ser usados para estimar o período gestacional com precisão comparável da 4^a à 21^a semana, permitindo que o Médico Veterinário faça inferências quanto à normalidade do desenvolvimento da gestação. As avaliações ultrassonográficas permitiram acompanhar o desenvolvimento gestacional nas ovelhas, obtendo-se resultados com alta correlação com o desenvolvimento das estruturas materno-fetais, que podem ser utilizados como valores de referência para o acompanhamento gestacional e detecção de anormalidades no desenvolvimento embrionário/fetal.

Palavras chave: ultrassom, gestação, desenvolvimento, ovinos.

B MODE ULTRASONOGRAPHY AND DOPPLERFLUXOMETRY IN THE GESTATIONAL EVALUATION OF SHEEP

ABSTRACT - The understanding about the physiology of the gestational process and embryonic/fetal development offers tools to make wise decisions regarding the management of the pregnant female, besides, these animals are used as experimental models, which reinforces the importance of the study of gestation in sheep. In this context, ultrasonography is the best option for the evaluation of gestation. It is safe and allows repeated evaluations to be made throughout the gestational process. The objective of this study was to assess the embryonic/fetal physiological development during pregnancy of sheep by means of ultrasonography in order to obtain normality parameters that can be used as a reference for the diagnosis of embryonic/fetal development alterations and to develop formulas for estimate gestational age. Thirty Santa Ines sheep weighing 45.4 ± 4.3 kg, between 2 and 5 years old were used. Ultrasound examinations were performed weekly from the 3rd to the 21st gestational week. For the statistical analysis Shapiro test was performed for normality with real or transformed measurements correlated with the gestational weeks by the Spearman test. When significant, parameter adjustments and gestational weeks were tested for regression models. A significance level of 5% was used and the results presented as mean $\pm$ SD (standard deviation). The gestational vesicle (GV), abdominal (AD), thoracic (TD), biparietal (BPD), ocular orbit (OO) and placentonium (PL) diameters were evaluated, as well as the crown-rump (CR), head-nose (HN), shoulder-blade (SB) umerus (UM), radius (RD), femur (FEM), tibia (TI), metatarsus (MTT), metacarpal (MCAR), heart rate (HR in beat/min) measurements obtained with Pulsed Doppler and measurements of the length of the base to the apex of the heart (LCOR) and width in the region closest to the base (WCOR). The highest coefficients of determination (R^2) were obtained for the biparietal diameter was 96.5% and for the metacarpal 93%. The abdominal diameter had 91.7% and the heart width 90.2%. The latter can be used to estimate the gestational period from the 4th to the 21st week, allowing the Veterinarian to make inferences about the normality of the development of gestation. Ultrasonographic evaluations allowed the monitoring of gestational development in sheep, resulting in high correlation with the development of maternal-fetal structures, which can be used as reference values for gestational follow-up and detection of abnormalities in embryo/fetal development.

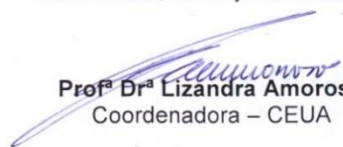
Keywords: ultrasound, gestation, development, sheep.

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Ultrassonografia modo B e Dopplerfluxometria materno fetal na avaliação gestacional de ovelhas**", protocolo nº 011708/14, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 07 de Julho de 2004.

Jaboticabal, 06 de julho de 2017.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Introdução

O exame ultrassonográfico tem demonstrado aplicabilidade singular na clínica veterinária. Por meio dessa técnica de imagem é possível realizar diagnóstico gestacional preciso, bem como monitorar a prenhez e detectar possíveis anormalidades da gestação e nos fetos. Esse é o método de diagnóstico mais preciso para avaliação da gestação, além de ser totalmente inócuo para a fêmea e conceptos. Permite estimar a idade gestacional, avaliar as condições dos ovários e do útero e verificar os sinais de viabilidade fetal (FELICIANO *et al.*, 2008).

Atualmente, a ecobiometria do conceito pode auxiliar no diagnóstico precoce de alterações de desenvolvimento, mediante a utilização de transdutores de alta resolução e aparelhos ultrassonográficos mais precisos. A ultrassonografia modo B vem sendo utilizada para diagnóstico de gestação em ovelhas desde os anos 80 como em pesquisa realizada por White *et al.* (1984).

Em ovelhas o diagnóstico gestacional pode ser feito aos 15 dias, por via transretal, sendo observado acúmulo de líquido no útero com formato circular ou alongado, devendo ser feita confirmação aos 17 dias quando é possível identificar a vesícula embrionária (FELICIANO *et al.* 2013). A precocidade no diagnóstico gestacional em ovelhas auxilia o produtor e médico veterinário na tomada de decisões rápidas que visam tanto a maximização do lucro como o bem-estar animal.

A aplicabilidade da ultrassonografia na avaliação clínica de ovelhas foi reforçada por Scott e Sargison (2010). Os autores citam trabalho de Romano e Christians (2008) no qual uma precisão maior que 99% para diagnóstico de prenhez, mais de 98% de precisão na diferenciação entre fêmeas não prenhes, com gestação simples ou gemelar, e determinação da quantidade de fetos de 97% foram alcançadas examinando-se pelo menos uma ovelha por minuto.

A fim de estimar a idade gestacional, Sergeev *et al.* (1990) avaliaram a correlação entre diâmetro biparietal e profundidade de tórax com a idade fetal em ovelhas com gestações simples, gêmeares e triplas, concluindo que existe correlação positiva entre as medidas e a idade gestacional. Utilizando transdutor transretal de 5 MHz e avaliando a medida dos placentônios, Doizé *et al.* (1996) e concluíram que

houve pouca correlação entre o tamanho dessas estruturas e a idade gestacional. De Bulnes *et al.* (1998) mensuraram diferentes estruturas de fetos ovinos, com o mesmo objetivo dos autores citados anteriormente, concluindo que os parâmetros que apresentaram maior correlação com o período gestacional foram os comprimentos craniocaudal, da nuca ao focinho e os diâmetros torácico, biparietal e das órbitas oculares.

A tecnologia “Doppler” é usada em ovinos principalmente como modelo experimental. Galan *et al.* (1998) induziram estresse por calor em ovelhas a fim de desenvolver um modelo de estudo para fetos com restrição de crescimento em humanos. Observaram redução na relação sístole/diástole, índice de pulsatilidade e de resistência, tanto no grupo controle como no grupo tratado, porém, quando comparados os grupos, nota-se maiores relação sístole/diástole e índice de pulsatilidade nos dois vasos citados.

Panarace *et al.* (2008) utilizaram em ovelhas a ultrassonografia “Doppler” para determinar as velocidades e índices vasculares no *ductus venosus* de fetos, concluindo que este método facilitou a avaliação do padrão de fluxo sanguíneo nessa região entre 52 e 143 dias de gestação.

O acompanhamento da gestação de ovelhas por meio da ultrassonografia de alta resolução e “Doppler” se faz necessária para que se obtenha novos valores de ecobiometria e para melhor compreensão da dinâmica vascular nos vasos envolvidos na gestação, além disso, pode permitir o diagnóstico de alterações morfológicas com maior precocidade.

A pesquisa é fundamental para que novas abordagens possam ser desenvolvidas para o diagnóstico de anormalidades gestacionais. Utilizando tecnologia de ponta como a ultrassonografia modo B de alta resolução, espera-se desenvolver uma metodologia para avaliação da gestação de ovelhas, que torne possível a detecção precoce de alterações que possam levar ao nascimento de um produto que não atenda às expectativas de produção ou natimorto.

A hipótese a ser testada é a de que a utilização da ultrassonografia modo B de alta resolução e “Doppler” permitirá, com melhor sensibilidade e especificidade, o acompanhamento da gestação em ovinos o estudo ecobiométrico e a caracterização da vascularização em ovelhas gestantes.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da ultrassonografia modo B de alta resolução na avaliação gestacional de ovelhas. Especificamente, objetivou-se: 1) determinar novas medidas ecobiométricas que possam favorecer o acompanhamento gestacional e do desenvolvimento dos conceptos; 2) avaliar a possibilidade de se prever anomalias no desenvolvimento dos conceptos de forma precoce; e 3) determinar valores para os índices vasculares de vasos relacionados à gestação e sua correlação com o desenvolvimento e viabilidade fetais.

1.4 Revisão de literatura

Ultrassonografia gestacional em ovelhas - Revisão de literatura

Gestational ultrasonography in sheep – Literature review

Resumo

A ultrassonografia é uma importante ferramenta para a avaliação de órgãos internos, além de não invasiva e segura. Com o avanço da tecnologia, surgiram mais possibilidades para sua aplicação por meio de novas técnicas que complementam a avaliação de forma mais acurada. Devido às semelhanças fisiológicas e por questões éticas, ovelhas são usadas como modelo experimental para humanos, especialmente no que diz respeito ao estudo de tecnologias modernas e que precisam de maior entendimento quanto ao seu funcionamento e aplicabilidade. O modo B ainda é o mais utilizado na rotina clínica e tem grande importância na Obstetrícia Veterinária, pois permite o acompanhamento da gestação e do desenvolvimento embrionário e fetal com avaliações repetidas durante todo o período gestacional. Esta revisão se propõe a mostrar a evolução da ultrassonografia com enfoque no estudo da gestação de ovelhas, seja como modelo experimental ou para aplicabilidade na Medicina Veterinária.

Palavras-Chave: diagnóstico por imagem, prenhez, ovinos.

Abstract

Ultrasonography is an important tool to evaluate internal organs, since it can be done in a non-invasive and safe way. Also, technological advancement opens a greater range of possibilities for its application with new techniques that allows a more accurate assessment. Due to physiological similarities and ethical issues, sheep are used as experimental model especially regarding the study of modern technologies. B mode is still the most used ultrasound mode in clinical routine and is especially important in Veterinary Obstetrics, since it allows the monitoring of the pregnancy and development of the embryo/fetus with repeated examinations throughout the gestational period. This review brings a vast number of researches on the use of ultrasonography for evaluation and study of the gestation in sheep.

Keywords: image diagnosis, pregnancy, ewe.

INTRODUÇÃO

As diferentes tecnologias ultrassonográficas possuem inúmeras aplicações em Medicina Veterinária, permitindo avaliar órgãos de forma segura e não invasiva, tornando-se assim, um dos principais exames complementares para o auxílio diagnóstico em animais (Simões, 2008). Para obstetrícia e reprodução de pequenos ruminantes, podem ser utilizadas na avaliação do sistema reprodutor em machos (Gouletsou, 2016) e fêmeas (Souza *et al.* 2011 e Figueira *et al.* 2015), além de permitir o acompanhamento do crescimento embrionário e fetal ao longo da gestação (Jones *et al.* 2016).

Técnicas de imagem diagnóstica por ultrassom têm evoluído desde escalas de cinza e duas dimensões (Wilkins, 1986; Buckrell, 1988) até tecnologias que permitem a reconstrução digital de imagens 3D - tridimensionais (Franz *et al.* 2004) e 4D – ultrassonografia volumétrica (Banerjee *et al.* 2016). A ultrassonografia “Doppler”

possibilita a avaliação detalhada da circulação sanguínea, permitindo o estudo do desenvolvimento vascular e seus aspectos relacionados ao período gestacional e tecidos materno-fetais (Santos *et al.* 2015; Stock *et al.* 2017). Recentemente, a elastografia tem possibilitado que se estime a consistência tecidual (Brito *et al.* 2015) e apresenta-se como uma “extensão da palpação”, dando melhor localização espacial, além de eliminar a subjetividade daquele método (Garra, 2015). Essas tecnologias têm potencial de uso ainda pouco explorado na obstetrícia de ovinos, sendo úteis para a aquisição de informações relevantes sobre o desenvolvimento materno-fetal.

Ressalta-se a importância de se utilizar modelos animais por questões éticas e devido às semelhanças fisiológicas entre ovinos e humanos (David *et al.* 2003). Estudos são realizados em ovelhas (Walsh *et al.* 2007) e fetos ovinos (David *et al.* 2003) como modelo experimental, por mais de 40 anos (Barry e Anthony, 2008).

Em razão disto, o entendimento acerca da fisiologia da gestação de ovinos é fundamental seja para otimizar a sua exploração econômica ou aprofundar o conhecimento acerca da espécie ou como modelo para humanos. Assim, esta revisão tem como objetivo trazer um panorama sobre a aplicabilidade da ultrassonografia para o estudo da gestação em ovelhas.

Ultrassonografia bidimensional - Modo B

O primeiro ultrassom em tempo real, conhecido como fast B-scanner foi desenvolvido por Walter Krause e Richard Soldner com Paetzold e Otto Kresse em 1965. No ano seguinte, Hofmann, Holländer e Weiser fizeram a primeira publicação de um trabalho utilizando essa tecnologia em ginecologia e obstetrícia humana (Hofmann *et al.* 1966). Posteriormente, a tecnologia utilizada no “fast B-scanner” foi aprimorada, tornando-se o que viria a ser conhecido como Modo B.

Em ovinos, há relatos do uso da ultrassonografia Modo B para diagnóstico de gestação desde os anos 80 com o trabalho de Wilkins (1986) buscando esclarecer quando seria possível realizar o diagnóstico de gestação pela via transretal e caracterizou “bolsas” repletas de líquido que se formam no útero aos 18 dias de gestação, correspondendo ao primeiro sinal de gestação. O autor observou também a presença de embriões entre os dias 20 e 25 e batimentos cardíacos a partir do 24º dia.

A precocidade no diagnóstico gestacional é desejável em todas as espécies de interesse zootécnico, já que permite adequações de manejo e planejamento estratégico na produção (Bragança, 2016). Medan *et al.* (2004) avaliaram a aplicabilidade da ultrassonografia para avaliação gestacional em cabras, diagnosticando gestação aos 19 dias e visibilizando saco gestacional aos $20,2 \pm 0,6$ dias e batimentos cardíacos aos $24,3 \pm 0,7$ utilizando frequências de 7,5 e 5MHz. Amer (2010), diagnosticou gestação aos $19,5 \pm 0,3$ e batimentos cardíacos $22,9 \pm 0,7$ dias de gestação. Os autores utilizaram frequências entre 6 e 8 MHz para a via transretal e 3,5 a 5MHz pela via transabdominal. De acordo com Moraes *et al.* (2008) os primeiros sinais de gestação em ovelhas são identificados no 15º dia quando se observa líquido no útero, porém, torna-se necessário aguardar até o 24º dia para realizar diagnóstico fidedigno, já que neste período é possível observar o embrião, além de batimentos cardíacos e, portanto, atestar a presença e viabilidade deste. As conclusões destas pesquisas em cabras e ovelhas são muito próximas e permitem a extrapolação de resultados de uma espécie para a outra. Pode-se inferir que mesmo os resultados das primeiras pesquisas realizadas em ovinos por Wilkins (1986), Buckrell (1988) e Restall *et al.* (1990) não diferiram muito dos resultados mais atuais.

Esse método também permite que se avalie a viabilidade fetal, que pode ser definida pela identificação de batimentos cardíacos e movimentação fetais (Barr, 1988). Os batimentos cardíacos foram percebidos por volta dos 25 dias e a movimentação a partir dos 32 dias (Wilkins, 1986; Moraes *et al.* 2008).

Além do diagnóstico de gestação e de atestar a viabilidade fetal, a ultrassonografia modo B pode ser utilizada para avaliação do crescimento e desenvolvimento das crias por meio da biometria e permitir a estimativa fidedigna da idade gestacional. Em ovelhas Santa Inês, Moraes *et al.* (2008) relataram achados ultrassonográficos relacionados ao tempo de gestação, permitindo inferir a idade gestacional e identificar parâmetros para acompanhar o desenvolvimento fetal (Tab. 1).

Tabela 1. Primeiro momento de visibilização ultrassonográfica de estruturas materno-fetais em ovelhas Santa Inês. Adaptado de Moraes *et al.* (2008).

Estruturas	Data	IV (dias)	CV (%)
	(média±DP) (dias)		
LI	16,3±1,3	15 - 19	1,6
VE	18,6±1,4	16 - 22	1,9
EB	22,8±1,9	18 - 26	3,6
MA	27,4±1,8	24 - 32	3,3
PL	25,1±2	20 - 29	4,1
BC	25,9±1,4	24 - 29	1,8
CU	35,1±1,5	32 - 39	2,2
CT	33,4±2,2	30 - 37	5,0
BG	36,7±1,5	34 - 39	2,1

MF	34,2±2	30 - 38	3,9
GO	40,9±1,2	39 - 43	1,5

IV: intervalo de visibilização; CV: coeficiente de variação.

LI: líquido intra uterino; VE: vesícula embrionária; EB: embrião; MA: membrana amniótica; PL: Placentônios; BC: batimentos cardíacos; CU: cordão umbilical; CT: diferenciação entre cabeça e tronco; BG: botões germinativos dos membros; MF: movimentação fetal; GO: globo ocular.

A biometria esquelética fetal foi avaliada como preditora da idade gestacional em ovelhas por Greenwood *et al.* (2002) em 32 animais mestiços. Após seis avaliações entre os 60 e 120 dias de gestação com transdutor transabdominal, os autores encontraram alta correlação entre diâmetro biparietal ($r=0,93$) e comprimento do metacarpo ($r=0,96$), com a idade gestacional, propondo as seguintes fórmulas para predição da idade gestacional: Tempo de Gestação (dias) = $28,4 + (1,06 \times \text{BPD}) + (0,0061 \times \text{BPD}^2)$ e Tempo de Gestação = $25,3 + (2,30 \times \text{MCL}) - (0,0138 \times \text{MCL}^2)$. Sendo BPD o diâmetro biparietal e MCL o comprimento do metacarpo.

Amer (2010) obteve o comprimento crânio caudal do 40º ao 89º dia de gestação e o diâmetro biparietal em cabras do 40º até o 109º dia utilizando transdutor transabdominal e encontrou alta correlação ($P<0,0001$) entre a idade gestacional e esses parâmetros. As fórmulas sugeridas para o cálculo da idade gestacional são: $\text{CRL} = 0,464x - 17,767$ e $\text{BPD} = 0,055x - 1,431$. Sendo CRL o comprimento crânio caudal, BDP o diâmetro biparietal, e 'x' a idade gestacional em dias.

Em ovelhas leiteiras avaliadas a partir do 25º até o 63º dia de gestação pela via transabdominal com transdutor linear, observou-se que o diâmetro biparietal e o comprimento crânio caudal apresentaram alta correlação ($r=0,93$ e $r=0,84$ respectivamente) e grande acurácia na estimativa da idade gestacional (Metodiev *et*

al. 2012), demonstrando mais uma vez, a importância e a precisão da biometria fetal na avaliação gestacional de ovelhas.

Para a realização do exame, recomenda-se o posicionamento quadrupedal e que os animais sejam gentilmente contidos para minimizar o estresse (Garcia, 1993), visto que o mesmo pode influenciar negativamente o desenvolvimento do conceito (Elmetwally *et al.* 2016).

Ali e Hayder (2007) e Feliciano, Oliveira e Vicente (2013) recomendam que se promova a elevação do abdômen para que o útero se aproxime do transdutor quando utilizada a via transretal. Na tentativa de aprimorar a técnica de realização do exame ultrassonográfico em ovelhas gestantes, Karen *et al.* (2004) avaliaram os benefícios de se fazer jejum de 12 horas e elevar o abdômen dos animais para diagnóstico gestacional e concluíram que essas medidas aumentam a precisão do exame. Apesar do resultado, o jejum não faz parte da metodologia dos demais trabalhos avaliados e pode-se creditar a melhora na qualidade das imagens, à elevação do abdômen. Para adequada exequibilidade são recomendados o transdutor linear - próprio para a via transretal - (Garcia, 1993) e linear ou convexo – próprio para a via transabdominal - (Jones *et al.* 2016).

Ultrassonografia “Doppler”

O efeito “Doppler” foi descrito primeiramente por Christian Johann Doppler em 1842 (Kawakama *et al.* 1993) e, atualmente tem sido amplamente utilizado na avaliação ultrassonográfica de parâmetros relacionados ao fluxo sanguíneo e vascularização (Feliciano *et al.* 2013). Em 1974, Barber *et al.* descreveram pela primeira vez o uso do modo B em tempo real em conjunto com o “Doppler”, chamando de “Duplex Scanner” o seu equipamento, o que pode ser considerado um marco para a ultrassonografia.

A fim de avaliar a aplicabilidade do modo “Doppler” Colorido para o diagnóstico precoce de gestação, Bragança *et al.* (2016) avaliaram o fluxo sanguíneo ovariano como sugerido por Figueira *et al.* (2015) e concluíram que aos 12 dias após a cobertura a precisão do diagnóstico gestacional foi de 85% devido ao aumento do fluxo sanguíneo.

Esta tecnologia foi usada por Acharya *et al.* (2007) para medir o volume de fluxo sanguíneo na artéria uterina em ovelhas prenhes, como modelo de estudo para humanos, a fim de investigar a correlação entre os valores calculados e os observados por meio de aferição direta no final da gestação e concluíram que houve alta correlação ($R=0,76$; $P<0,0001$) entre os métodos, obtendo variação de 90 a 800 mL/min para aferição direta e 110 a 900 mL/min para o cálculo feito com uso do “Doppler”.

Beltrame *et al.* (2017) obtiveram valores para vários parâmetros “Doppler” das artérias uterinas esquerda e direita em ovelhas, contribuindo para o entendimento das características do fluxo sanguíneo ao longo da gestação. Após dividirem a gestação em terços, observaram aumento nos valores de velocidade de pico sistólico, velocidade diastólica final, velocidade máxima e velocidade média conforme a gestação avançava.

Elmetwally e Bollwein (2016) avaliaram o fluxo sanguíneo da artéria uterina ipsilateral ao corno gravídico na 20ª semana gestacional e a cada três dias, a partir do dia do parto, durante quatro semanas e notaram redução no diâmetro da artéria uterina e também correlação positiva ($P<0,05$) entre volume sanguíneo e diâmetro da artéria uterina, aceleração do fluxo sanguíneo e velocidade média do fluxo: ($r=0,62$), ($r=0,32$) e ($p=0,51$) respectivamente. Os autores ainda ressaltam que é um estudo

inovador que determina valores de referência para a espécie ovina durante o final da gestação e o puerpério.

Existe interesse na compreensão da fisiologia dos ovários de ovelhas prenhes. Estudando a função luteal, Figueira *et al.* (2015) avaliaram a vascularização dos corpos lúteos em ovelhas Santa Inês e concluíram que houve correlação entre as concentrações de progesterona e a área vascularizada ($r=0,48$; $p<0,05$). As concentrações aumentaram acompanhando o aumento da área vascularizada. O mesmo não ocorreu com as concentrações do referido hormônio e a área vascularizada após luteólise. Neste momento os níveis de progesterona diminuíram mais rapidamente do que a área vascularizada do corpo lúteo.

Elastografia

É uma tecnologia relativamente nova que cria imagens da “dureza” dos tecidos, como um aprimoramento da técnica de palpação, porém, fornece melhor informação sobre localização espacial e é menos subjetiva (Garra, 2015). Em Medicina Veterinária, já foi utilizada na avaliação de rins, baço e fígado de cães (Holdsworth *et al.* 2014). Os autores relatam que a profundidade dos órgãos avaliados, o peso e o sexo dos animais influenciam os valores obtidos.

A elastografia foi utilizada por Peralta *et al.* (2015) para estudar o amadurecimento da cérvix de ovelhas com parto induzido pela administração de 8mL de dexametasona. Por meio da elastografia “Shear Wave”, avaliaram a consistência do segundo anel cervical e constataram que de quatro a cinco horas após a injeção, houve redução de rigidez. Concluíram que esta tecnologia pode ser utilizada para identificar partos prematuros com antecedência.

Em estudo pioneiro, Silva (2017) avaliou a rigidez de placentônios, pulmões, fígado e rins de fetos ovinos por meio da elastografia “Acoustic Radiation Force

Impulse” (ARFI) a partir da 10^a semana gestacional até o parto. Determinando que, a velocidade de cisalhamento renal e dos placentônios se mantém constantes durante a gestação ($P = 0,076$ e $0,34$, respectivamente) enquanto a mesma velocidade dos pulmões e fígado fetal variaram com relação ao tempo gestacional ($P < 0,001$) e estiveram correlacionadas com a idade gestacional ($R^2 = 0,80$). Entre a 16^a e a 35^a semana, a velocidade de cisalhamento pulmonar decaiu gradativamente enquanto a do fígado aumentou a partir da 14^a semana, com valor máximo registrado na última semana gestacional. Neste estudo, a elastografia ARFI, permitiu identificar os padrões de rigidez e provavelmente pôde estimar o desenvolvimento e maturidade orgânica fetal.

Considerações finais

Os resultados de pesquisas mais antigas acerca do diagnóstico gestacional de ovelhas são similares aos de pesquisas mais recentes, o que permite inferir que se pode obter o diagnóstico gestacional com segurança por volta do 20^o dia de gestação, quando se observa acúmulo de líquido no útero e presença de embrião, sendo os batimentos cardíacos observados entre os 20 e 30 dias. Quanto à biometria fetal, apesar de diferenças entre raças e períodos gestacionais avaliados, o diâmetro biparietal, o comprimento crânio caudal, o comprimento do metacarpo e a circunferência abdominal parecem ser as medidas mais aplicáveis à determinação da idade gestacional. A tecnologia “Doppler” é bastante utilizada em ovelhas, sendo muito útil no acompanhamento e estudo gestacionais nessa espécie e a elastografia é uma técnica promissora na avaliação do desenvolvimento e maturidade fetal em ovinos, ainda que como modelo experimental.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por concessão de bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão de bolsa de estudo (2014/15422-0).

Referências bibliográficas

ACHARYA, G.; SITRAS, V.; ERKINARO, T.; MAKIKALLIO, K.; KAVASMAA, T.; PAKKILA, M.; HUHTA, J.C.; RASANEN, J. Experimental validation of uterine artery volume blood flow measurement by “Doppler” ultrasonography in pregnant sheep. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v.29, p.401–406, 2007.

ALI, A.; HAYDER, M. Ultrasonographic assessment of embryonic, fetal and placental development in Ossimi sheep. **Small Rum Res**, v.73, p.277-278, 2007.

AMER, H.A. Ultrasonographic assessment of early pregnancy diagnosis, fetometry and sex determination in goats. **Anim Rep Sci**, v.117, 2009.

BANERJEE, J.; KLINK, C.; NIESSEN, W.J.; MOELKER, A.; WALSUM, T.V.; 4D Ultrasound Tracking of Liver and its Verification for TIPS Guidance, **IEEE Trans on Med Imaging**, v. 35, n.1, p.52-62, 2016.

BARBER, F.E.; BAKER, D.W.; NATION, A.W.; STRANDNESS, D.E.; REID, J.M. Ultrasonic duplex echo-”Doppler” scanner. **IEEE Trans on Biomed Eng**, v.21, p.109–113, 1974.

BARR, F.J. Pregnancy diagnosis and assessment of fetal viability in the dog: A review. **J. Small Anim Pract**, v.29, p.647-656, 1988.

BARRY, J.S.; ANTHONY, R.V. The pregnant sheep as a model for human pregnancy. **Theriogenology**, v.69, p.55-67, 2008.

BELTRAME, R.T.; COVRE, C.; LITTIG, L.B.; MARTINS, A.B.; QUIRINO, C.R.; BARTHOLAZZI JUNIOR, A.; COSTA, R.L.D. Transrectal “Doppler” sonography of uterine blood flow in ewes during pregnancy. **Theriogenology**. (2017), doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.12.026.

BRAGANÇA, G.M.; BALARO, M.F.A.; FONSECA, J.F.; PINTO, P.H.N.; ROSA, R.M.; RIBEIRO, L.S.; ALMEIDA, M.S.; FABJAN, J.M.G.S.; GARCIA, A.R.; BRANDAO, F.Z. “Doppler” ultrasound in the diagnosis of early pregnancy in sheep. **Anim Rep**, v.13, n.3, p.587, Jul./Sept. 2016.

BRITO, M.B.S.; FELICIANO, M.A.R.; COUTINHO, L.N.; SIMÕES, A.P.R.; MARONEZI, M.C.; GARCIA, P.H.S.; USCATEGUI, R.R.; ALMEIDA, V.T.; CRIVELARO, R.M.;

VICENTE, W.R.R. ARFI Elastography of Healthy Adults Felines Testes, **Acta Scien Vet**, v.43, 2015.

BUCKRELL, B.C. Application of ultrasonography in reproduction in sheep and goats. **Theriogenology**, v.29, p.71-84, 1988.

DAVID, A.; COOK, T.; WADDINGTON, S.; PEEBLES, D.; NIVSARKAR, M.; KNAPTON, H.; MIAH, M.; DAHSE, T.; NOAKES, D.; SCHNEIDER, H.; RODECK, C.; COUTELLE, C.; THEMIS, M. Ultrasound-Guided Percutaneous Delivery of Adenoviral Vectors Encoding the b-Galactosidase and Human Factor IX Genes to Early Gestation Fetal Sheep In Utero. **Hum Gene Ther**. v.14, p.354-364, 2003.

De BULNES, A.G.; MORENO, J.S.; SEBASTIÁN, A.L. Estimation of fetal development in Manchega dairy ewes by transrectal ultrasonographic measurements. **Small Rum Res**, v. 27, p. 243-250, 1998.

DOIZÉ, F.; VAILLANCOURT, D.; CARABIN, H.; BÉLANGER, D. Determination of gestational age in sheep and goats using transrectal ultrasonographic measurement of placentomes. **Theriogenology**, v. 48, p. 449-460, 1996.

ELMETWALLY, M.; RHON, K.; MEINECKE-TILLMANN, S. "Doppler" Sonography is a useful method to assess the effects of maternal anxiety on intrauterine fetal growth in pregnant sheep and goats. **Qual Prim Care**, v.24, n.4, p.137-145, 2016.

ELMETWALLY, M.; BOLLWEIN, H. Uterine blood flow in sheep and goats during the peri-parturient period assessed by transrectal "Doppler" sonography. **Anim Rep Scie** v.176, p.32-30, 2016.

FELICIANO, M.A.R.; VICENTE, W.R.R.; LEITE, C.A.L.; MUZZI, L.A.L. Novas perspectivas no diagnóstico ultra-sonográfico gestacional em cadelas – revisão de literatura. In: **Clin Vet**, n.73, p.56-60, 2008.

FELICIANO, M.A.R.; OLIVEIRA, M.E.F.; VICENTE, W.R.R. **Ultrassonografia na Reprodução Animal**. MedVet, 1ª ed, São Paulo, p.4 e 145, 2013.

FIGUEIRA, L.M.; FONSECA, J.F.; ARASHIRO, E.K.N.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; RIBEIRO, A.C.S.; OBA, E.; VIANA, J.H.M.; BRANDÃO, F.Z. Colour Doppler Ultrasonography as a Tool to Assess Luteal Function in Santa Inês Ewes. **Rep in Dom Ani**, n. 50, p. 643-650, 2015.

FRANZ, S.; HOFMANN-PARISOT, M.M.; BAUMGARTNER, W. Evaluation of three-dimensional ultrasonography of the bovine mammary gland. **Am J Vet Res** v.65, n.8, p.1159-1163, 2004.

GALAN, H.L.; HUSSEY, M.J.; CHUNG, M.; CHYU, J.K.; HOBBS, J.C.; BATTAGLIA, F.C. "Doppler" velocimetry of growth-restricted fetuses in an ovine model of placental insufficiency. **Am J of Gyn**. v. 178, n. 3, p. 451-456, 1998.

GANAI, B.A.; KHAN, M.Z.; ISLAM, R.; MAKHDOOMI, D.M.; QURESHI, S.; WANI, G.M. Evaluation of different techniques for pregnancy diagnosis in sheep. **Small Rumin Res**, v.85, 2009.

GARCIA, A.; NEARY, M.K.; KELLY, G.R.; PIERSON, R.A. Accuracy of ultrasonography in early pregnancy diagnosis in the ewe. **Theriogenology**, v.39, p.847-861, 1993.

GARRA, B.S. Elastography: history, principles, and technique comparison. **Abdom Imaging**, v.40, p.680–697, 2015.

GOULETSOU, P.G. Ultrasonographic examination of the scrotal contents in rams. **Small Rumin Res**, (2016). <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.12.022>.

GREENWOOD, P.L.; SLEPETIS, R.M.; MCPHEE, M.J.; BELL, A.W. Prediction of stage of pregnancy in prolific sheep using ultrasound measurement of fetal bones. **Reprod Fertil Dev**, v.14, p.7-13, 2002.

HOFMANN, D.; HOLLÄNDER, H.J.; WEISER, P. Neue Möglichkeiten der Ultraschalldiagnostik in der Gynäkologie und Geburtshilfe. **Fortschr Med**, v.84, n.689, 1966.

HOLDSWORTH, A.; BRADLEY, K.; BIRCH, S.; BROWNE, W.J.; BARBERET, V. Elastography of the normal canine liver, spleen and kidneys. **Vet Radiol Ultrasound**, v.55, n.6, p.620–627, 2014.

JONES, A.K.; GATELY, R.E.; MCFADDEN, K.K.; ZINN, S.A.; GOVONI, K.E.; REED, S.A. Transabdominal ultrasound for detection of pregnancy, fetal and placental landmarks, and fetal age before Day 45 of gestation in the sheep, **Theriogenology**, v.85, p.939-945, 2016.

KAREN, A.; SZABADOS, K.; REICZIGEL, J.; BECKERS, J.F.; SZENCI, O. Accuracy of transrectal ultrasonography for determination of pregnancy in sheep: effect of fasting and handling of the animals. **Theriogenology**, v.61, p.1291–1298. 2004.

KAWAKAMA, J.; KODAIRA, S.; CERRI, G.G. Física. In: CERRI, G.G., ROCHA, D.C. **Ultra-sonografia abdominal**, São Paulo: Sarvier, p.1-14, 1993.

MEDAN, M.; WATANABE, G.; ABSY, G.; SASAKI, K.; SHARAWY, S.; TAYA, K. Early pregnancy diagnosis by means of ultrasonography as a method of improving reproductive efficiency in goats. **Reprod Fertil Dev**, v.50, n.4, 2004.

METODIEV, N.; DIMOV, I.; RALCHEV, I.; RAICHEVA, E. Measurements of foetal growth via transabdominal ultrasonography during first half of pregnancy at ewes from synthetic population Bulgarian milk. **Bulg J Agri Sci**, v.18, n.4, 2012.

MORAES, E.P.B.X.; SANTOS, M.H.B.; AGUIAR FILHO, C.R.; NEVES, J.P.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. Avaliação ultra-sonográfica do desenvolvimento

embrionário-fetal de ovinos da raça Santa Inês. **Ciê Anim Bras**, v.9, n.1, p.148-155, 2008.

PANARACE, M.; GARNIL, C.; CANÉ, L.; RODRÍGUEZ, E.; MEDINA, M. Echo-“Doppler” ultrasonographic assessment of resistance and velocity of blood flow in the ductus venosus throughout gestation in fetal lambs. **Theriogenology**, n. 70, p. 648-654, 2008.

PERALTA, L.; MOURIER, E.; RICHARD, C.; CHARPIGNY, G.; LARCHER, T.; AÏT-BELKACEM, D.; BALLA, N.K.; BRASSELET, S.; TANTER, M.; MULLER, M.; CHAVATTE-PALMER, P. In Vivo Evaluation of Cervical Stiffness Evolution during Induced Ripening Using Shear Wave Elastography, Histology and 2Photon Excitation Microscopy: Insight from an Animal Model. **PLoS ONE**, v.10, n.8. 2015.

RESTALL, B.J.; MILTON, J.T.B.; KLONGYUTTI, P.; KOCHAPAKDEE, S. Pregnancy diagnosis in Thai native goats. **Theriogenology**, v.34, p.313-317, 1990.

ROMANO, J.E.; CHRISTIANS, C.J. Early pregnancy diagnosis by transrectal ultrasonography in ewes. **Small Rum Res**. n. 77, p. 51–57, 2008.

SANTOS, V.J.C.; SIMPLICIO, K.; SANCHEZ, D.; COUTINHO, L.; TEIXEIRA, P.; BARROS, F.; ALMEIDA, V.; RODRIGUES, L.; BARTLEWSKI, P.; OLIVEIRA, M.; FELICIANO, M.; VICENTE, W. B-Mode and “Doppler” sonography of the mammary glands in dairy goats for mastitis diagnosis. **Rep Dom Anim**, v.50, p.251-255, 2015.

SCOTT, P.R.; SARGISON, N.D. Ultrasonography as an adjunct to clinical examination in sheep. **Small Rumin Res**, n. 92, p. 108-119, 2010.

SERGEEV, L.; KLEEMANN, D.O.; WALKER, S.K.; SMITH, D.H.; GROSSER, T.I.; MANN, T.; SEAMARK, R.F. Real-time ultrasound imaging for predicting ovine fetal age. **Theriogenology**, v. 34, n. 3, p. 593-601, 1990.

SILVA, P.A. Ultrassonografia modo b e elastografia acoustic radiation force impulse (arfi) de tecidos materno fetais durante a gestação em ovinos. **Dissertação**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP. fev/2017.

SIMÕES, J. Os princípios físicos, a imagem e os artefatos na ecografia em modo B. 2008. Disponível em http://www.veterinaria.com.pt/media/dir_27001/VCP1-1-e22.pdf. ISSN 1647-3019. Acesso em: 01 de junho de 2017.

SOUZA, A.H.; SILVA, E.P.B.; CUNHA, A.P.; GÜMEN, A.; AYRES, H.; BRUSVEEN, D.J.; GUENTHER, J.N.; WILTBANK, M.C. Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high-producing dairy cows. **Theriogenology**, V.75, n.4, p.722-733, 2011.

STOCK, E.; VANDERPERREN, K.; HAERS, H.; DUCHATEAU, L.; HESTA, M.; SAUNDERS, J.H. Quantitative differences between the first and second injection of

contrast agent in contrast-enhanced ultrasonography of feline kidneys and spleen. **Ultrasound Med Biol**, v.43, n.2, 2017.

WALSH, W.R.; STEPHENS, P.; VIZESI, F.; BRUCE, W.; HUCKLE, J.; YU, Y. Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Tendon–Bone Healing in an Intra-articular Sheep Knee Model. **J Arthroscopic Rel Surg**, v.23, n.2, p.197-204, 2007.

WHITE, I.R.; RUSSEL, A.J.; FOWLER, D.G. Real-time ultrasonic scanning in the diagnosis of pregnancy and the determination of fetal numbers in sheep. **Vet Res**. n.115, p. 140–143, 1984.

WILKINS, J.F. Detection of pregnancy and embryos in ewes before day 30 using ultrasound imaging. **Proc Aust Soc Anim Prod**, v.17, 1986.

WOO, J.S.K. A short History of the Real-time ultrasound scanner. Disponível em <http://www.ob-ultrasound.net/history-realtime.html>. Acesso em 25 de maio de 2017.

2. CAPÍTULO 2 – Ultrassonografia modo B e parâmetros ecobiométricos para estudo do desenvolvimento embrionário/fetal em ovinos

Resumo. Objetivou-se avaliar o desenvolvimento materno-fetal durante a gestação fisiológica de ovelhas por meio da ultrassonografia modo B e desenvolver fórmulas para predição de idade gestacional. Trinta ovelhas Santa Inês foram selecionadas para o estudo. Foram realizados exames ultrassonográficos semanais desde a 3ª até a 21ª semana gestacional durante toda a gestação. Para a análise estatística, realizou-se teste de Shapiro para normalidade, com medidas reais ou transformadas correlacionadas com as semanas gestacionais pelo teste de Spearman. Quando significativo, foram testados os ajustes dos parâmetros e semanas gestacionais à modelos de regressão. Foi utilizado nível de significância de 5% e os resultados apresentados como média±DP (desvio padrão). Foram avaliados diâmetros da vesícula gestacional (VG), abdominal (DA), torácico (DT), biparietal (DBP), da órbita ocular (OO) e dos placentônios (PL), além dos comprimentos crâniocaudal (CC), da nuca ao focinho (NF), da escápula (ESCA), do úmero (UME), do rádio (RD), do metacarpo (MCAR), do fêmur (FEM), da tíbia (TI), do metatarso (MTAR) e dos rins (RIM); mensuração da frequência cardíaca (FC em bat/min) obtida por meio do “Doppler” Pulsado e as medidas de comprimento da base ao ápice do coração (CCOR) e de largura da parede esquerda à direita na região mais próxima à base (LCOR). Os maiores coeficientes de determinação (R^2) foram obtidos para o diâmetro biparietal foi de 96,5% e para o metacarpo de 93%. O diâmetro abdominal apresentou 91,7% e a largura do coração 90,2%. Estes últimos podem ser usados para estimar o período gestacional com precisão comparável da 4ª à 21ª semana, permitindo que o

Médico Veterinário faça inferências quanto à normalidade do desenvolvimento da gestação. As avaliações ultrassonográficas permitiram acompanhar o desenvolvimento gestacional nas ovelhas, obtendo-se resultados com alta correlação com o desenvolvimento das estruturas materno-fetais, que podem ser utilizados como valores de referência para o acompanhamento gestacional e detecção de anormalidades no desenvolvimento dos tecidos avaliados.

Palavras-chave: ultrassonografia, gestação, desenvolvimento, ovinos.

Introdução

O diagnóstico gestacional, determinação da viabilidade fetal e estimativa do tempo de gestação são fatores importantes na produção e pesquisa com ovinos, uma vez que permitem o planejamento consciente do manejo destes animais e crescimento do rebanho. Neste contexto, a ultrassonografia é considerada ferramenta diagnóstica relevante no exame gestacional, pois permite que múltiplas avaliações sejam feitas durante todo o período gestacional (Valasi *et al.* 2017). Este fato torna possível a adequação do manejo a qualquer tempo durante a gestação.

A ultrassonografia começou a ser aplicada para avaliação gestacional em ovelhas no final da década de 60 (Lindhal, 1968; Fraser e Robertson, 1968) permitindo diagnóstico gestacional de forma acurada aos 65 dias. Um ano depois foi relatado que o exame transretal utilizando “Doppler” (Lindhal, 1968) resultava em diagnósticos mais precisos. A técnica foi validada em 2111 ovelhas por Lindhal no ano de 1971 permitindo também a determinação da viabilidade fetal, porém, ainda não era possível obter imagens que representassem o fluxo sanguíneo. O mesmo autor em 1976, utilizando um aparelho de ultrassonografia com uma tecnologia ainda rudimentar, que conhecemos hoje como modo B, obteve 100% de detecção de prenhez em 251 ovelhas e 84% de acurácia para diferenciar gestações simples de múltiplas.

Os aparelhos de ultrassom atuais têm tecnologia mais desenvolvida e proporcionam imagens de melhor qualidade, sendo que os primeiros sinais de gestação em ovelhas podem ser identificados a partir do 15º dia (Moraes *et al.* 2008), porém, mesmo estudos mais antigos como o de Wilkins (1986) apresentaram resultados semelhantes, identificando a gestação no 18º dia e batimentos cardíacos no 24º.

O momento no qual se realiza a identificação ultrassonográfica das estruturas do embrião/feto ou suas divisões anatômicas, também pode ser utilizado como

método que auxilia na determinação da idade gestacional, além de avaliar se o desenvolvimento está adequado, correlacionando viabilidade e saúde do concepto. Os estudos de Moraes *et al.* (2008) e Valasi *et al.* (2017), identificaram pela primeira vez: líquido intrauterino entre o 14° e 21° dia, embrião entre o 23° e 25° dia, batimento cardíaco entre o 25° e 26° dia entre outras observações.

Greenwood *et al.* (2002) avaliaram 32 ovelhas a cada 10 dias desde o 60° até o 120° dia gestacional e definiram que o diâmetro biparietal (DBP) e o comprimento do metacarpo (MCAR) permitem a estimativa precisa da idade gestacional em dias ($R^2=95\%$). Já Metodiev *et al.* (2012) estudaram ovelhas leiteiras entre o 25° e 63° dia gestacional, identificando correlação semelhante ($r=0,93$) para o DBP e para o comprimento craniocaudal ($r=0,84$).

Tendo em vista a incontestável importância do diagnóstico e acompanhamento gestacional ultrassonográfico e com base na limitada disponibilidade de estudos que avaliem todo o período gestacional de ovinos, o objetivo deste estudo foi acompanhar o desenvolvimento da gestação em ovelhas a fim de se obter dados que possam ser utilizados como referência para avaliar a saúde do embrião/feto ovino, além de obter fórmulas matemáticas para a estimativa da idade gestacional.

Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil (protocolo nº 11708-14).

Foram selecionadas 30 ovelhas Santa Inês, pluríparas, adultas (idade entre 2 e 5 anos) e com peso corporal de $45,4 \pm 4,3$ kg, consideradas saudáveis após avaliação de histórico clínico (sem antecedentes mórbidos ou anormalidades reprodutivas), exame clínico geral e normalidade ao exame hematológico.

Os animais eram procedentes do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, mantidos em aprisco, alimentados com silagem de milho, ração comercial e água *ad libitum*. Trinta dias antes de iniciar o período experimental os animais foram condicionados para a realização de tricotomia da região abdominal e exames ultrassonográficos transretal e transabdominal, uma vez por semana, para minimizar o estresse induzido pelo manejo.

Findado o condicionamento, os animais foram submetidos ao protocolo de indução do cio como citado por Souza *et al.* (2007) (Fig. 1). Um dia depois da retirada do CIDR®, as fêmeas foram alocadas por um período de dois dias com um carneiro com eficiência reprodutiva comprovada. No peito do animal foi aplicada mistura de óleo de soja e corante (tinta xadrez), para permitir a identificação das fêmeas cobertas.

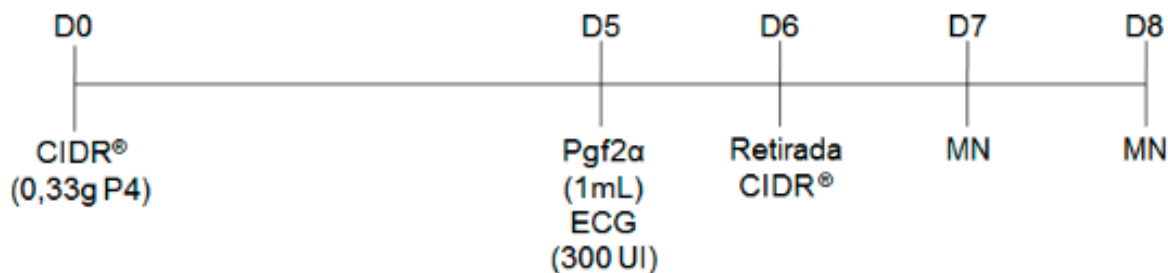


Fig. 1. Ilustração de esquema do protocolo curto de sincronização de cio e monta natural para ovinos.

O dia posterior à identificação da cobertura foi considerado como o 1º dia gestacional e ao 21º dia foi realizada avaliação ultrassonográfica transretal para o diagnóstico gestacional. Caso resultasse positivo, as avaliações ultrassonográficas semanais eram iniciadas imediatamente, com os animais em posição quadrupedal mediante contenção física. Os exames foram realizados com o equipamento MyLab™30 VET (Esaote S.p.A., Genova, Ligúria, Itália) transdutor linear (7,5 MHz) por via transretal até a 8ª semana de gestação. A partir da 9ª e até a semana que antecedeu o parto, foi utilizado transdutor linear (7,5 MHz) por via transabdominal.

Ao exame ultrassonográfico realizou-se varredura em cortes longitudinais e transversais objetivando a identificação do útero, placentônios e as estruturas embrionárias ou fetais: vesícula gestacional, abdome, tórax, cabeça, garupa, órbita ocular, escápula, úmero, rádio, metacarpo, fêmur, tíbia, metatarso, rins, coração, pulmão, fígado, intestino e câmaras gástricas, além de quaisquer outras estruturas materno-fetais que pudessem ser identificadas. Para todos os resultados apresentados, considerar o período de 11 a 34 dias de gestação como embrionário (Jainudeen e Hafez, 2000) e o período fetal tendo início aos 35 dias de gestação (Hafez e Hafez, 2000).

Uma vez localizadas as estruturas descritas, era registrada a idade gestacional da primeira visibilização e todas as imagens salvas no aparelho ultrassonográfico,

para que após o exame fossem mensurados em mm: diâmetros da vesícula gestacional (VG), abdominal (DA), torácico (DT), biparietal (DBP), da órbita ocular (OO) e dos placentônios (PL), além dos comprimentos crâniocaudal (CC), da nuca ao focinho (NF), da escápula (ESCA), do úmero (UME), do rádio (RD), do metacarpo (MCAR), do fêmur (FEM), da tíbia (TI), do metatarso (MTAR) e dos rins (RIM); mensuração da frequência cardíaca (FC em bat/min) obtida por meio do “Doppler” Pulsado e as medidas de comprimento da base ao ápice do coração (CCOR) e de largura da parede esquerda à direita na região mais próxima à base (LCOR).

Análise estatística

Foi realizada com auxílio do software R-project (R® foundation for statistical computing, Austria). Inicialmente foi testada a distribuição dos parâmetros (teste de Shapiro). Posteriormente as medidas reais ou transformadas foram correlacionadas com as semanas gestacionais pelo teste de Spearman. Quando significativo, foram então testados os ajustes dos parâmetros e semanas gestacionais à modelos de regressão (linear, quadrático e cúbico). Para os parâmetros cuja análise gráfica apresentasse algum tipo de platô com relação ao tempo gestacional, foi realizada análise de curvas ROI (receiver-operating characteristic) utilizando as semanas gestacionais como referência para o cálculo do ponto de corte, sensibilidade e especificidade na predição das semanas gestacionais posteriores a dito platô. O nível de significância foi definido em 5% para todos os testes e os resultados apresentados como a média $\pm$ DP (desvio padrão).

Resultados

Foram avaliadas 30 ovelhas, totalizando 22 gestações simples, sete duplas e uma tripla. Todas as gestações foram à termo, os partos ocorreram sem necessidade de intervenção e 39 borregos nasceram saudáveis.

A via transretal foi utilizada até a 8ª semana de gestação visto que o útero se encontra mais dorsal nesta fase de avaliação, estando mais próximo ao transdutor, facilitando assim, a aquisição de imagens. Além disso, o abdome das ovelhas foi posicionado sobre a perna do operador para que a distância entre o útero e o transdutor fosse reduzida. A partir da 9ª semana, foi utilizada a via transabdominal,

em razão do desconforto com o posicionamento descrito anteriormente e pelo fato do útero localizar-se mais próximo à parede abdominal devido ao aumento de peso.

A primeira avaliação foi realizada ao 21º dia de gestação (3ª semana). Constatou-se que nesta fase é possível visibilizar o embrião, vesícula gestacional, batimentos cardíacos e placentônios apesar de não apresentarem o típico formato de 'C' ou 'O' (Fig. 2). O embrião apresenta-se como estrutura ecogênica em contato com o útero e seu coração pode ser identificado como uma pequena região do embrião que apresenta rápida movimentação (batimentos cardíacos). Neste momento, também é possível medir o comprimento craniocaudal.



Fig. 2. Imagem ultrassonográfica em modo B de útero ovino com três semanas de gestação. Embrião (círculo pontilhado) e traçado “Doppler” (setas). Arquivo pessoal. FCAV/UNESP, 2017.

Na 4ª semana, em alguns animais é possível medir o coração. Neste momento, também foi possível verificar a diferenciação entre abdome, tórax, cabeça e tronco (Fig. 3). A partir da 6ª semana detectaram-se os rins em alguns fetos (Fig. 4) e fêmur, úmero, tíbia, radio, metacarpo e metatarso também foram visibilizados. Na 7ª semana a vesícula gestacional e o comprimento craniocaudal não puderam mais ser mensurados, devido ao aumento de tamanho do feto e as estruturas pulmonares foram visibilizadas (Fig.4).

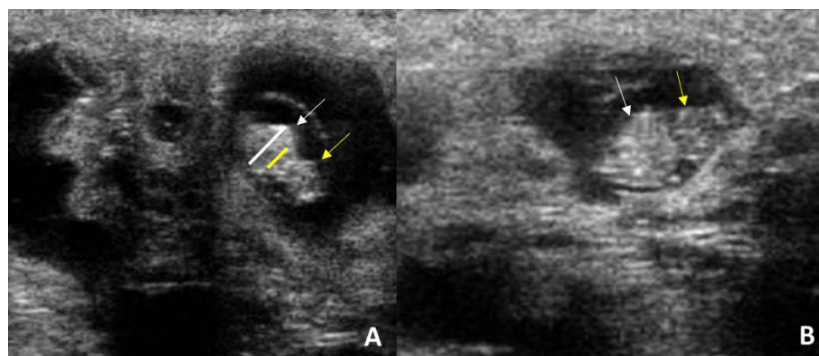


Fig. 3. Imagem ultrassonográfica em modo B de útero ovino com quatro semanas de gestação. A: seta amarela: cabeça; seta branca: tronco; linha amarela: tórax e linha branca: abdômen. B: seta amarela: cabeça; seta branca: tórax. Arquivo pessoal. FCAV/UNESP, 2017.

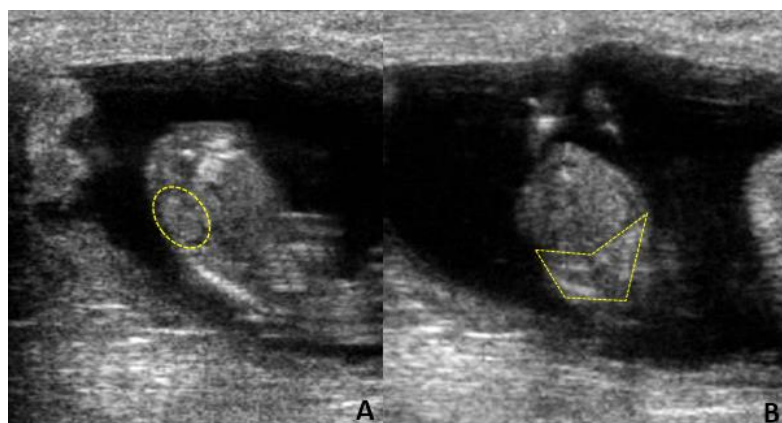


Fig. 4. Imagem ultrassonográfica em modo B de útero ovino grávidico com seis semanas. A: círculo pontilhado delimita o rim. Útero ovino grávidico com sete semanas. B: polígono delimita os pulmões. Arquivo pessoal. FCAV/UNESP, 2017.

Da 8^a até a 15^a semanas foi possível realizar a biometria da maioria dos órgãos propostos na metodologia. No entanto a partir da 13^a semana foi difícil mensurar a distância da nuca ao focinho devido ao tamanho fetal e a partir da 16^a semana a identificação dos ossos também se tornou difícil não só pelo tamanho, mas também pelas características ultrassonográficas, posicionamento e movimentos fetais. A dificuldade de se obter imagens satisfatórias que permitam a mensuração dos parâmetros aumentou gradativamente com o avanço da gestação para a maioria das estruturas avaliadas.

As semanas gestacionais nas quais foi possível visibilizar e identificar pela primeira vez as estruturas anatômicas materno-fetais pelo exame ultrassonográfico são apresentadas na Tabela 1.

Tabela. 1. Semana gestacional (SG) na qual foram visibilizadas pela primeira vez as estruturas materno-fetais, em 30 ovelhas Santa Inês saudáveis, avaliadas semanalmente (desde o 21º dia de gestação até a semana do parto) pela ultrassonografia modo B.

*Exceto escápula

Estrutura	SG	Estrutura	SG
Embrião	3	Movimentação fetal	6
Placentônio	3	Ossos dos membros*	6
Batimentos cardíacos	3	Costelas	6
Vesícula gestacional	3	Membros proeminentes	6
Coração	4	Focinho	6
Abdome	4	Pulmão	7
Cabeça	4	Câmaras estomacais	7
Diferenciação Cabeça/Tronco	4	Massa intestinal	8
Tórax	4	Fígado	8
Órbita ocular	5	Coluna vertebral	8
Cordão umbilical	5	Cálices renais	11
Tubo neural	5	Alças intestinais	12
Rins	6	Árvore brônquica	15

O período em que foi possível a mensuração de cada uma das estruturas, os modelos de regressão calculados para a estimativa da idade gestacional e o coeficiente de determinação para cada um destes modelos encontram-se na Tabela 2. Todas as variáveis mensuradas apresentaram correlação significativa com as semanas gestacionais ($P < 0,001$ e $r > 0,500$). Os parâmetros e modelos de regressão das variáveis que apresentaram coeficientes de determinação maiores que 90% ($R^2 > 90\%$), assim como da FC, são apresentados na Figura 5.

Tabela 2. Fórmulas para determinação de idade gestacional em 30 ovelhas Santa Inês saudáveis, avaliadas semanalmente (desde o 21º dia de gestação até a semana do parto) pela ultrassonografia modo B.

SG: semana gestacional; R²: coeficiente de determinação; DBP: diâmetro biparietal; MCAR: comprimento do metacarpo; DA: diâmetro abdominal; DT: diâmetro torácico; RD: comprimento do rádio; MTAR: comprimento do metatarso; LCOR: largura do coração; FEM: comprimento do fêmur; UME: comprimento do úmero; NF: distância nuca-focinho; RIM: comprimento do rim; ESCA: comprimento da escápula; CCOR: comprimento do coração; TI: comprimento da tíbia; OO: órbita ocular; CC: comprimento do embrião/feto; PL: diâmetro do placentônio; VG: vesícula gestacional; FC: frequência cardíaca. * Difícil mensuração. Das 180 medias esperadas, apenas 44 foram realizadas. # O comportamento desta variável foi explicado por um modelo de regressão cúbico e não linear como os demais parâmetros. Todas as variáveis foram medidas em mm. Exceto a FC (bat/min).

Variável	SG	R ² (%)	Fórmula preditiva
DBP	4 - 17	96,5	$SG = 3,7 + 0,3 \times DBP$
MCAR	7 - 15	93,0	$SG = 7,0 + 0,2 \times MCAR$
DA	4 - 21	91,7	$SG = 3,9 + 0,2 \times DA$
DT	6 - 21	91,3	$SG = 4,8 + 0,2 \times DT$
RD	7 - 18	91,2	$SG = 7,1 + 0,2 \times RD$
MTAR	7 - 16	90,3	$SG = 7,4 + 0,2 \times MTAR$
LCOR	4 - 21	90,2	$SG = 4,9 + 0,5 \times LCOR$
FEM	7 - 16	89,0	$SG = 7,1 + 0,2 \times FEM$
UME*	7 - 16	88,9	$SG = 7,2 + 0,2 \times UME$
NF	6 - 14	88,7	$SG = 4,8 + 0,1 \times NF$
RIM	7 - 20	88,0	$SG = 4,8 + 0,4 \times RIM$
ESCA*	8 - 14	87,6	$SG = 7,2 + 0,3 \times ESCA$
CCOR	4 - 21	87,3	$SG = 5,1 + 0,4 \times CCOR$
TI	7 - 14	82,6	$SG = 7,2 + 0,2 \times TI$
OO	6 - 14	81,8	$SG = 6,0 + 0,4 \times OO$
CC	3 - 7	80,4	$SG = 2,65 + 0,11 \times CC$

PL	3 - 8	71,6	$SG = 3,6 + 0,2 \times PL$
VG	3 - 7	68,9	$SG = 3,1 + 0,1 \times VG$
FC [#]	3 - 21	46,3	$SG = -75,9 + 1,9 \times FC - 0,01 \times FC^2 + 0,00003 \times FC^3$

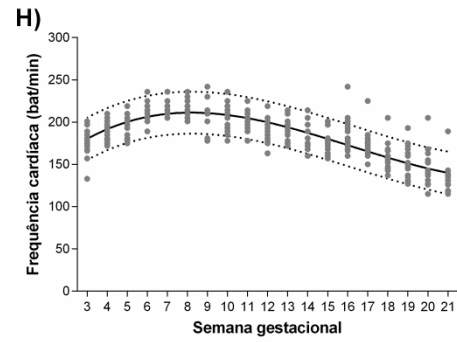
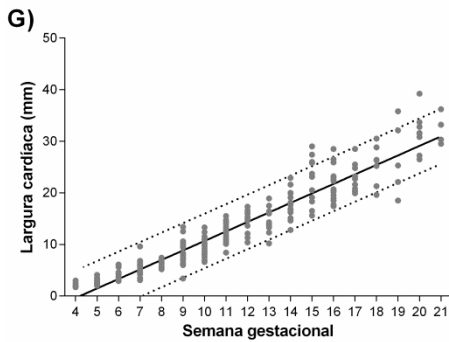
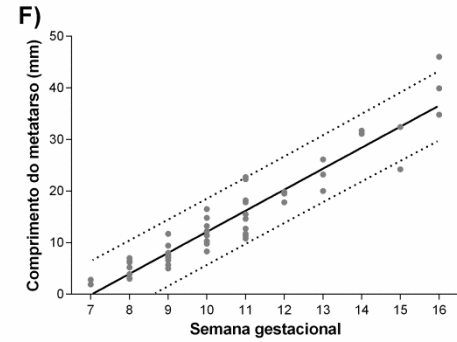
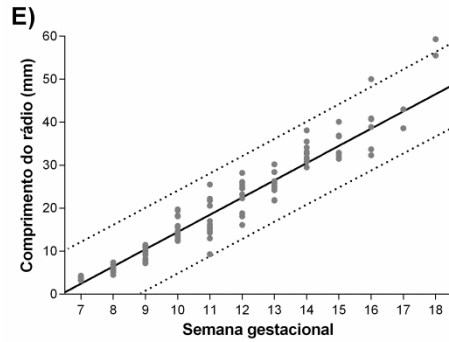
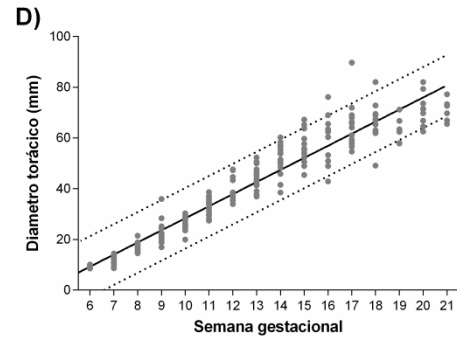
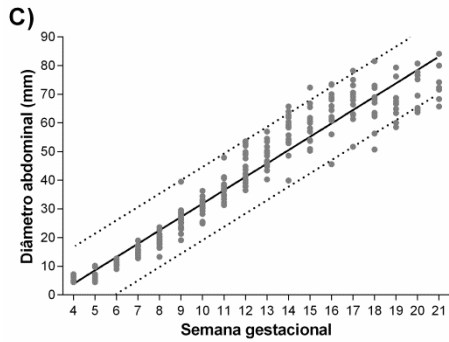
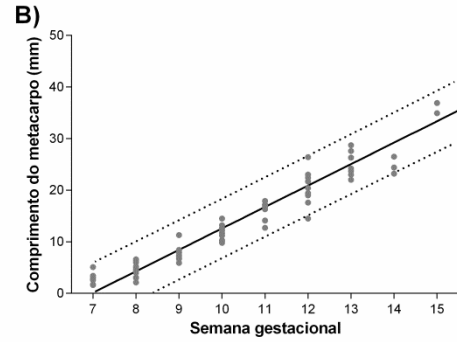
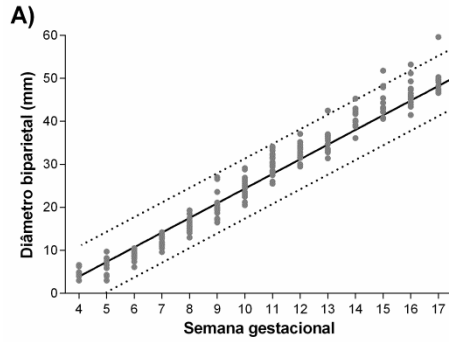


Fig. 5. Representação gráfica do comportamento das variáveis que apresentaram coeficientes de determinação maiores que 90% e da frequência cardíaca ao longo da gestação, avaliadas semanalmente por meio de ultrassonografia em 30 ovelhas Santa Inês saudáveis. As linhas contínuas correspondem ao modelo de regressão adaptado a este parâmetro e as pontilhadas às bandas de previsão à 95% de confiança. A) Diâmetro Biparietal; B) Comprimento do Metacarpo; C) Diâmetro Abdominal; D) Diâmetro Torácico; E) Comprimento do Rádio; F) Comprimento do Metatarso; G) Largura cardíaca e H) Frequência cardíaca (bat/min).

Na análise gráfica do comportamento de FC, DBP e PL (Figura 6) foi possível determinar que esses parâmetros não apresentaram um comportamento completamente linear durante os períodos nos quais foram mensuradas, por isso, foram feitas as análises ROC para determinar se um valor de corte para cada uma delas poderia indicar um período gestacional específico. Assim, uma FC inferior a 144 bat/min permite indicar que a gestação se encontra na última semana com uma sensibilidade de 93%, especificidade de 95% e área sob a curva de 95%; um DBP maior do que 47,4 mm indica que o período gestacional superou as 17 semanas com sensibilidade de 100% e especificidade de 92,5% e área sob a curva de 97,2%; e um diâmetro do PL maior do que 22,3 mm sugere que a idade gestacional é maior que 9 semanas, com sensibilidade de 91,5%, especificidade de 80,7% e área sob a curva de 92,6%.

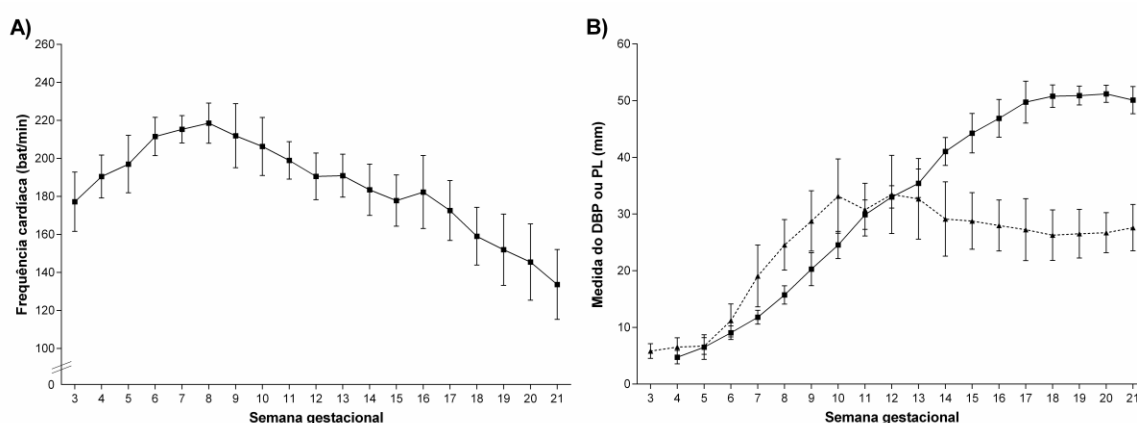


Fig. 6. Representação gráfica da média e DP de: A) Frequência cardíaca (bat/min) e B) Diâmetro biparietal (DBP, linha contínua) e Diâmetro do Placentônio (PL, linha

pontilhada). Avaliados semanalmente ao longo da gestação por meio de ultrassonografia modo B em 30 ovelhas Santa Inês saudáveis.

Discussão

Todos os parâmetros ultrassonográficos materno-fetais mensurados mostraram correlação significativa com as semanas gestacionais e permitem estimar a idade gestacional com acurácia variável e em diferentes períodos da gestação de ovelhas Santa Inês. Dentre estes parâmetros, apenas o DA e a LCOR são mensuráveis desde a 4^a até a 21^a semana gestacional e também permitem a estimativa mediante um modelo de regressão linear (Tabela 2) com um coeficiente de determinação maior que 90%. Ou seja, estas duas variáveis, na maior parte da gestação, permitem estimar a semana na qual o processo gestacional se encontra com apenas 10% de margem de erro. Além disso, foi possível determinar a semana gestacional na qual muitas estruturas, órgãos e regiões anatômicas materno-fetais de interesse para avaliação ultrassonográfica gestacional são detectadas.

Segundo Carr *et al.* (2011) o DA, parece ser o parâmetro que melhor se relaciona com crescimento fetal em ovinos ($R^2=82,5\%$) e esta conclusão corrobora nossos resultados ($R^2=91,7\%$) se levamos em conta todo o período gestacional, já que limitando os períodos de avaliação, este parâmetro seria o terceiro mais confiável entre as variáveis que estudamos. Esse resultado é equiparável também ao relatado por Barbera *et al.* (1995) entre a 8^a e 19^a semanas gestacionais.

Para Greenwood *et al.* (2002) e Metodiev *et al.* (2012) o DBP é o parâmetro que melhor estima a idade gestacional nesta espécie com coeficientes de determinação de 95% e 83%, respectivamente. Nossos resultados efetivamente acompanham as assertivas destes autores, pois o DBP resultou no maior coeficiente de determinação da idade gestacional ($R^2=96\%$) entre as variáveis estudadas, mas é aplicável apenas entre a 4^a e 17^a semana gestacional, período em que é possível mensurá-lo, o que acompanha o período de que os estudos supracitados avaliaram (7^a-17^a e 6^a-9^a semanas gestacionais, respectivamente).

O MCAR também foi considerado um bom preditor da idade gestacional por Greenwood *et al.* (2002) com coeficiente de determinação de 94%, similar ao que encontramos neste estudo ($R^2=93\%$) e que ocupa o segundo lugar entre as variáveis que estudamos. Porém, esse parâmetro é confiável apenas entre a 7^a e 15^a semana

gestacional, quando é possível identificar o osso com segurança, coincidindo com o período gestacional que o citado autor avaliou.

Com coeficiente de determinação de 91,3%, o DT é o quarto parâmetro mais confiável entre as variáveis estudadas, sendo a sua acurácia bastante próxima da resultante para o DA, porém deve-se ter em conta que o DT é apenas mensurável após a 6ª semana gestacional, tempo no qual as costelas tornam-se visíveis, o que limita em duas semanas a aplicabilidade deste parâmetro em relação ao DA. Bulnes *et al.* (1998) encontraram correlação de 96% para o DT.

A biometria do coração mostra-se bastante relevante para a estimativa da idade gestacional com coeficientes de determinação de 90,2% para LCOR e 87,3 para CCOR, ocupando o 7º e 13º lugares na escala de confiabilidade deste estudo. É importante salientar que estes parâmetros são mensuráveis quase na totalidade do processo gestacional (4ª à 21ª semana) e que são resultados inovadores nesta espécie, pois em ruminantes apenas foram encontrados estudos em vacas (Lazim *et al.*, 2016) e mini-cabras (Kandiel *et al.*, 2015) reportando coeficientes de determinação confiáveis e similares aos encontrados no presente estudo ($R^2=97\%$ e 95% , respetivamente) para a LCOR, que ainda, para mini-cabras foi descrito como mais confiável do que a CCOR ($R^2=93\%$).

Fêmur e tíbia apresentaram coeficientes de determinação de 89% e 82,6% e foram visíveis da 7ª a 16ª e da 7ª a 14ª semanas, respetivamente. Esses resultados são mais relevantes do que os reportados por Barbera *et al.* (1995) que relataram que o FEM obteve coeficientes de determinação de 43,5% e a tíbia de 60,4% entre 8ª até a 19ª SG e menos acurados do que os relatados por James *et al.* (2015) para o fêmur ($R^2=98,7\%$) entre a 5ª a 16ª semanas. Consideramos essas mensurações pouco aplicáveis para determinar a idade gestacional, uma vez que a visibilização dos ossos é dificultada pelo crescimento e movimentação fetais, além da ocorrência de sombra acústica, que dificulta e até impede a identificação apropriada destas estruturas e podem explicar a variação observada entre os estudos supracitados.

A NF resultou em coeficiente de determinação de 88,7% para a estimativa da idade gestacional entre a 6ª e 14ª semana, o comprimento craniocaudal 80,4% entre a 3ª e 7ª semana e o diâmetro da órbita ocular 81,8% entre a 6ª e 14ª semana. Estes parâmetros foram consideravelmente menos acurados para a estimativa da idade

gestacional do que o descrito por Bulnes *et al.* (1998) nos mesmos períodos de avaliação ($R^2=95\%$, 94% , 92% , respectivamente), com estas discrepâncias podendo ser resultantes da diferença racial entre os animais estudados. Apesar do aceitável coeficiente de determinação destas variáveis, não é possível a sua mensuração durante a maior parte do período gestacional, devido ao tamanho e movimentação fetais que dificultam a aquisição de imagens de qualidade, o que limita sua utilização como ferramenta para a estimativa da idade gestacional.

O rim foi mensurável da 7ª à 20ª semana e apresentou acurácia moderada ($R^2=88\%$) para estimar a idade gestacional. Bulnes *et al.* (1998) e Ali e Hayder (2007) relataram resultados semelhantes aos nossos ($R^2=82,0\%$ e $80,5\%$, respectivamente), mas não traçam comentários quanto à aplicabilidade desta variável, provavelmente pela limitada eficácia em comparação com outros parâmetros estudados assim como demonstrado neste estudo. Para Carr *et al.* (2011) o cálculo do volume renal tem potencial para ser associado ao crescimento fetal.

O PL foi moderadamente confiável ($R^2=71,6\%$) para estimar a idade gestacional apenas entre a 3ª e 8ª semanas, após esse período esta estrutura alcança diâmetro maior de 22,3 mm e seu crescimento não se correlaciona mais com a idade gestacional. Nota-se com o avanço da gestação, uma crescente dificuldade em se visibilizar placentônios de maior tamanho. Outro fator a ser levado em conta na avaliação dessa estrutura é a impossibilidade de se avaliar sempre o mesmo placentônio ao longo da gestação, o que poderia resultar em uma análise mais precisa do desenvolvimento do mesmo. Estes achados corroboram os resultados expostos por Bulnes *et al.* (1998) que descrevem grande variação no tamanho desta estrutura entre a 5ª e 13ª semanas e de Doizé *et al.* (1997) que encontraram baixo coeficiente de determinação ($R^2=15,6\%$) entre o diâmetro do placentônio e a idade gestacional entre a 5ª e 13ª semanas.

Bulnes *et al.* (1998) obtiveram coeficiente de determinação de 76% para estimar a idade gestacional com o VG entre a 3ª e 5ª semana gestacional. Este resultado é próximo do obtido neste estudo ($R^2=68,9\%$) entre a 3ª e 7ª semana, indicando que o VG não é um parâmetro relevante na estimativa da idade gestacional, como o é em outras espécies domésticas como cães e gatos (Beccaglia *et al.*, 2016).

A FC apresentou correlação aceitável com a idade gestacional ($r=-0,65$) e seu comportamento durante a gestação (3ª à 21ª semana) é explicado por um modelo de regressão cúbica ($R^2=46,3\%$), no qual a frequência se eleva gradativamente até a 8ª semana para depois diminuir paulatinamente até a 21ª, este mesmo resultado foi observado por Godfrey *et al.* (2010) entre a 3ª e 10ª semana gestacional obtendo um coeficiente de determinação similar ($R^2=39\%$) para o modelo cúbico. Apesar da FC não permitir a estimativa adequada da idade gestacional nesta espécie, como já tinha sido relatado por Moreno *et al.* (1996), esta variável pode ser útil na avaliação da viabilidade fetal e ainda indicativa de maturidade fetal, como inferido a partir do estudo realizado por Unno *et al.* (1999). Estes autores elucidaram a função do cortisol fetal durante o período final da gestação (120º dia até o parto) e definiram este hormônio como o responsável parcial pela ontogênica elevação da pressão arterial e reflexa redução da FC (de 178 ± 2 bat/min no dia 120 para 143 ± 2 bat/min no dia 140) considerado fator necessário para a funcionalidade pós-natal do sistema cardiovascular. Essas assertivas corroboram os resultados obtidos neste estudo, que revelam valores inferiores a 144 bat/min como indicadores acurados (sensibilidade 93% e especificidade 95%) de que a gestação se encontra na última semana e condizem com os reportados anteriormente para este período na espécie ovina (Aiumlamai *et al.* 1992; Moreno *et al.* 1996).

O momento a partir do qual são identificadas estruturas anatômicas materno-fetais como placentônios, alças intestinais fetais ou eventos relacionados à gestação como a movimentação fetal, pode auxiliar tanto na estimativa da idade gestacional, como na avaliação do desenvolvimento embrionário e fetal. Estes eventos já tinham sido descritos por Moraes *et al.* (2008) em ovelhas da raça Santa Inês entre o 15º e 45º dia gestacional; e por Valasi *et al.* (2017) em ovelhas Chios-cross durante o período gestacional inteiro. Os resultados destes autores são compatíveis com nossas observações, no entanto, nas condições estudadas foi possível identificar placentônios, batimentos cardíacos e diferenciar a cabeça do tronco uma semana antes do estipulado por eles (3ª SG vs 4ª SG); a cavidade torácica da abdominal foram diferenciadas duas semanas antes (5ª SG vs 3ª SG); os rins cinco (11ª SG vs 6ª SG) e os pulmões oito semanas antes (15ª SG vs 7ª SG). A antecipação na identificação dos acontecimentos supracitados pode ser resultante da diferença na qualidade de

imagem dos equipamentos de ultrassom utilizados, bem como da técnica para a obtenção das imagens, frequência e período de avaliação.

O comprimento da escápula e úmero, apesar de resultarem em coeficientes de determinação aceitáveis (88,9% e 87,6%, respectivamente), são parâmetros tecnicamente difíceis de mensurar e o período no qual são aplicáveis é bastante limitado. Além disso, não foram encontrados estudos prévios que avaliassem estas medidas para a estimativa da idade gestacional ovina, tornando-as pouco relevantes para este fim. Em espécies similares como caprinos, Rihab *et al.* (2012) e Lega *et al.* (2007) definiram que o comprimento do úmero permite estimativa acurada ($R^2=95\%$) da idade gestacional, enquanto o comprimento da escápula foi considerado parâmetro limitado ($R^2=80,0\%$) para este fim, em comparação com outras variáveis.

O conhecimento sobre a fisiologia da gestação faz possível o diagnóstico de anormalidades, nesse sentido, os achados encontrados neste experimento se constituem em importante padrão de avaliação gestacional e na tomada de decisões estratégicas acerca da produção e possíveis intervenções necessárias para a garantia da saúde das matrizes e das crias.

Variáveis com comportamento linear, além de serem úteis para a estimativa da idade gestacional, também podem ser usadas para averiguar se o desenvolvimento fetal transcorre dentro da normalidade. Se estas variáveis apresentarem valores menores ou maiores do que o esperado, conclui-se que pode haver anormalidades que conduzem ao subdesenvolvimento ou malformações fetais. É o caso dos diâmetros biparietal, abdominal, torácico e comprimentos do metacarpo, rádio, metatarso e largura do coração. Devendo-se levar em conta os períodos nos quais as variáveis são confiáveis para serem utilizadas. Destacam-se o diâmetro abdominal e a largura cardíaca por serem mensuráveis desde a 3ª até a 21ª semana gestacional.

Conclusão

Todas as variáveis biométricas materno-fetais avaliadas mostraram correlação significativa com o tempo de gestação, sendo as mais acuradas para a estimativa da idade gestacional, o diâmetro biparietal e o comprimento do metacarpo. No entanto, a avaliação desses parâmetros é possível apenas da 4ª à 17ª semana gestacional, enquanto que o diâmetro abdominal e a largura do coração permitem uma estimativa com precisão equiparável e na maior parte do período gestacional (4ª à 21ª semana).

Também foi possível identificar estruturas antes do estipulado pela literatura, como placentônios, rins, pulmões, além de batimentos cardíacos, e a diferenciação entre a cabeça, o tórax e o abdome. Estes resultados podem auxiliar na estimativa da idade gestacional, na avaliação do desenvolvimento embrionário/fetal e na identificação de alterações próprias deste processo fisiológico em ovelhas Santa Inês. Destaca-se a frequência de avaliação, que proporciona uma quantidade de dados que dá mais credibilidade aos cálculos estatísticos e a simplicidade e precisão das fórmulas desenvolvidas neste estudo.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo pela concessão de bolsa de estudo (2014/15422-0).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

Referências Bibliográficas

Aiumlamai, S. *et al.* (1992). Real-time ultrasonography for determining the gestational age of ewes. *Vet. Rec.* **131**:24, 560-562.

Ali, A. and Hayder, M. (2007). Ultrasonographic assessment of embryonic, fetal and placental development in Ossimi sheep. *Small Rumin Res.* **73**, 277-282.

Barbera, A. *et al.* (1995). Ultrasonographic assessment of fetal growth: Comparison between human and ovine fetus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **173**, 6.

Beccaglia, M. *et al.* (2016). Determination of gestational time and prediction of parturition in dogs and cats: an update. *Reprod. Domest. Anim.* **51**:51, 12-17.

Bulnes, A.G. *et al.* (1998). Estimation of fetal development in Manchega dairy ewes by transrectal ultrasonographic measurements. *Small Rumin Res.* **27**, 243-245.

Carr, D.J. *et al.* (2011) Ultrasonographic assessment of growth and estimation of birthweight in late gestation fetal sheep. *Ultrasound Med Biol.* **37**:10, 1588-1595.

- Doizé, F. *et al.* (1997). Determination of gestational age in sheep and goats using transrectal ultrasonographic measurement of placentomes. *Theriogenology*, **48**, 449-460.
- Fraser, A. F., and Robertson, J.G. (1968). Pregnancy diagnosis and detection of fetal life in sheep and pigs by an ultrasonic method. *Br. Vet. J.*, **724**, 239-244.
- Godfrey, R.W. *et al.* (2010). Evaluation of Ultrasonography to Measure Fetal Size and Heart Rate as Predictors of Fetal Age in Hair Sheep. *Sheep goat res. J.*, **25**, 60-65.
- Greenwood, P.L. *et al.* (2002). Prediction of stage of pregnancy in prolific sheep using ultrasound measurement of fetal bones. *Reprod. Fertil. Dev.* **14**, 7-13.
- Hafez, E.S.E., Hafez, B. Reproductive cycles. In: Reproduction in farm animals. Philadelphia: Lippincott williams & Wilkins, p. 55-67, 2000.
- Jainudeen, M.R., Hafez, E.S.E. Gestation, prenatal physiology, and parturition. In: Hafez, E.S.E., Hafez, B. Reproduction in farm animals. 7. ed. Philadelphia: Lippincott williams & wilkins, p. 140-155, 2000.
- James A. A. *et al.* (2015). Ultrasonographic Determination of Gestational Age in Yankasa Ewes. *J. Anim. Vet. Adv.*, **5**:11, 1169-1175.
- Kandiel, M.M.M. *et al.* (2015). Ultrasonographic assessment of fetal growth in miniature “Shiba” goats (*Capra hircus*). *Animal Reprod. Sci.* **162**, 1-10.
- Lazim, E.H. *et al.* (2016). Relationship between gestational age and transabdominal ultrasonographic measurements of fetus and uterus during the 2nd and 3rd trimester of gestation in cows. *Asian Pac J Reprod.* **5**:4, 326-330.
- Lindhal, I. L. (1968). Pregnancy diagnosis in ewes in continual breeding. *J. Anim. Sci.* **27**, 1511 (Abstract).
- Lindhal, I. L. (1971). Pregnancy diagnosis in the ewe by intrarectal Doppler. *J. Anim. Sci.* **52**, 922-924.
- Lindhal, I. L. (1976). Pregnancy diagnosis in ewes by ultrasonic scanning. *J. Anim. Sci.* **45**, 1135-1140.

Metodiev, N. *et al.* (2012). Measurements of foetal growth via transabdominal ultrasonography during first half of pregnancy at ewes from synthetic population Bulgarian milk. *Bulg. J. Agric. Sci.* **18**, 4.

Moraes, E.P.B.X. *et al.* (2008). Avaliação ultra-sonográfica do desenvolvimento embrionário-fetal de ovinos da raça Santa Inês. *Ci. Anim. Bras.*, **9**:1, 148-155.

Moreno, C. *et al.* (1996). Fetal heart rate measurement and sonographic fetometry for determination of fetal age in sheep. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* **103**:11, p. 478-480.

Rihab, M.A., *et al.* (2012). The accuracy of gestational age predicted from femur and humerus length in Saanen goats using ultrasonography. *Acta Vet. BRNO.* **81**, 295–299.

Conference Proceedings Souza, J.M.G. *et al.* (2007). Uso de protocolos curtos para indução de estro em ovelhas Santa Inês. In proceedings of the **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. Accessible in: www.cbpa.org.br/publicacoes.do. 2007.

Unno, N., *et al.* (1999). Blood pressure and heart rate in the ovine fetus: ontogenic changes and effects of fetal adrenalectomy. *Am. J. Physiol.* **276**, 248–256.

Valasi, I., *et al.* (2017). Developmental anatomy of sheep embryos, as assessed by means of ultrasonographic evaluation. *Small Rumin res.* **152**, 56-73.

Wilkins, J.F. (1986). Detection of pregnancy and embryos in ewes before day 30 using ultrasound imaging. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* **17**, 48

3. CAPÍTULO 3 - Avaliação dos índices dopplerfluxométricos de estruturas materno-fetais em ovelhas gestantes

Resumo. O objetivo deste estudo foi avaliar o fluxo sanguíneo das principais estruturas materno-fetais da gestação fisiológica de ovelhas por meio do Doppler espectral durante todo período gestacional em ovelhas. Trinta ovelhas Santa Inês com peso entre $45,4 \pm 4,3$ kg e idade de 2 a 5 anos foram selecionadas. As avaliações foram realizadas semanalmente da 3^a até a 21^a semana gestacional. Foram obtidas as velocidades de pico sistólico (VPS), diastólica final (VDF) e o índice de resistência (IR) da artéria uterina, artérias ovarianas, aorta fetal e artéria umbilical e dos placentônios utilizando o Doppler espectral. Realizou-se a análise de variância e a comparação mínima significativa das médias foi obtida pelo teste de BH com P ajustado $< 0,05$. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão. Para a aorta fetal foi observado aumento dos valores da VDF e redução da VPS e do IR ao longo da gestação. Para a artéria uterina a VPS e a VDF não apresentaram variação significativa, já o IR apresentou redução na última semana. Para os placentônios, a VDF e a VPS não apresentaram um padrão de comportamento. O IR apresentou maior valor nas semanas iniciais e redução a partir da 14^a semana. Para a artéria umbilical foram encontrados aumento dos valores da VDF ao longo da gestação. Para a velocidade de pico sistólico não houve diferença significativa, já o IR foi reduzido no final da gestação. Os índices das artérias ovarianas não apresentaram relevância estatística. Observa-se de modo geral, aumento do fluxo sanguíneo que coincide com o avanço do desenvolvimento fetal. Espera-se que os resultados obtidos contribuam para um entendimento mais completo acerca das mudanças hemodinâmicas decorrentes da gestação.

Palavras chave: Ultrassonografia, Doppler, ovinos, materno fetal.

Introdução

É fundamental que o embrião/feto e estruturas relacionadas à gestação recebam adequado aporte sanguíneo e, para tal, diversas modificações (Sarafana *et al.* 2007) envolvendo a hemodinâmica do sistema circulatório ocorrem e são caracterizadas principalmente pelo aumento do débito cardíaco e diminuição na resistência vascular sistêmica (Hameed e Sklansky, 2007), visando garantir adequada perfusão uterina e desenvolvimento fetal (Eghbali *et al.* 2005; Blanco *et al.* 2008).

Para avaliação de parâmetros relacionados ao fluxo sanguíneo e vascularização de diferentes tecidos do sistema reprodutor dos animais, a ultrassonografia Doppler tem sido utilizada com sucesso (Feliciano *et al.* 2013), sendo que sua aplicabilidade foi testada e validada em pequenos ruminantes como um método preditor de gestação, pela avaliação do fluxo sanguíneo ovariano (Bragança *et al.* 2016) com 100% de precisão aos 17 dias de gestação, e em estudos concernentes à vascularização gestacional (Acharya *et al.* 2007; Elmetwally e Bollwein, 2016; Beltrame *et al.* 2017).

Segundo Khong (2004), a perfusão placentária prejudicada, devido à inadequada invasão trofoblástica das artérias espirais, está associada à pré-eclâmpsia e à restrição do crescimento fetal intrauterino. Por este motivo, Acharya *et al.* (2007) ressaltam que o Doppler pode ser usado para identificar gestações com risco de desenvolver tais complicações. Esses autores mediram o volume do fluxo sanguíneo na artéria uterina durante a gestação de ovelhas e concluíram que as velocidades absolutas desse fluxo refletem o volume do fluxo sanguíneo uteroplacentário em ovelhas prenhes.

Elmetwally e Bollwein, (2016) avaliaram o comportamento do fluxo sanguíneo na artéria uterina ipsilateral ao corno gravídico com o objetivo de avaliar a aplicabilidade da tecnologia Doppler na avaliação gestacional de ovelhas. O resultado demonstrou alterações no decorrer da gestação. Os autores ressaltam ainda o potencial para a predição da idade gestacional e possibilidade de se realizar mapeamento do fluxo sanguíneo, com aplicabilidade prática na rotina obstétrica.

Em ovelhas são poucos os trabalhos que avaliam, durante todo o período gestacional, o fluxo sanguíneo nos vasos envolvidos neste processo e sabe-se que a hemodinâmica na gestação está relacionada ao desenvolvimento embrionário/fetal, portanto, objetivou-se obter os índices dopplerfluxométricos dos principais vasos

envolvidos na gestação de ovelhas avaliadas durante todo o período gestacional a fim de se contribuir para o incremento do conhecimento acerca da fisiologia da gestação nesta espécie.

Materiais e Métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil (protocolo nº 11708-14). Foram selecionadas 30 ovelhas Santa Inês, pluríparas, adultas, saudáveis (idade entre 2 e 5 anos) e com peso corporal médio de $45,4 \pm 4,3$ kg.

Os animais eram procedentes do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, mantidos em aprisco, alimentados com silagem de milho, ração comercial e água *ad libitum*. Trinta dias antes de iniciar o período experimental os animais foram condicionados para a realização de tricotomia da região abdominal e dos exames ultrassonográficos, para minimizar o estresse induzido pelo manejo experimental.

Findado o condicionamento, os animais foram submetidos ao protocolo de indução do cio como citado por Souza *et al.* (2007) (Fig. 1). Após 24 horas, as fêmeas foram alocadas por um período de dois dias com um carneiro com eficiência reprodutiva comprovada. No peito do animal foi aplicada mistura de óleo de soja e corante (tinta xadrez), para permitir a identificação das fêmeas cobertas.

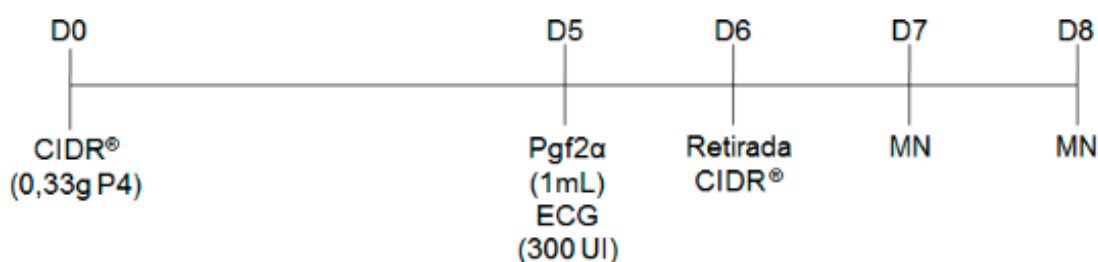


Figura 1. Ilustração de esquema do protocolo curto de sincronização de cio e monta natural para ovinos.

O dia posterior à identificação da cobertura foi considerado como o 1º dia gestacional e ao 21º dia foi realizada avaliação ultrassonográfica utilizando-se o modo B por via transretal para o diagnóstico de gestação, caracterizada pela visibilização

da vesícula embrionária com embrião em seu interior e avaliação de viabilidade fetal por meio da identificação de batimentos cardíacos. O modo B também foi utilizado para obter a localização aproximada dos vasos avaliados, que foi confirmada por meio do Doppler em cores. Caso o diagnóstico de gestação fosse positivo, as avaliações ultrassonográficas semanais eram iniciadas imediatamente, com os animais em posição quadrupedal mediante contenção física.

A via transretal foi utilizada até a 8ª semana de gestação visto que o útero se encontrou mais dorsal nesta fase de avaliação, estando mais próximo ao transdutor, facilitando assim, a aquisição de imagens. Além disso, o abdome das ovelhas foi posicionado sobre a perna do operador para que a distância entre o útero e o transdutor fosse reduzida. A partir da 9ª semana, foi utilizada a via transabdominal (adaptado de Elmetwally *et al*, 2016), em razão do desconforto com o posicionamento descrito anteriormente e pelo fato do útero localizar-se mais próximo à parede abdominal devido ao aumento de peso. Foi necessário realizar a tricotomia abdominal quando a via utilizada foi a transabdominal e com o avanço da gestação foi necessário ampliar a área tricotomizada devido ao tamanho dos fetos que passaram a ocupar grande parte da cavidade abdominal.

Os exames foram realizados com o equipamento MyLab™30 VET (Esaote S.p.A., Genova, Ligúria, Itália) transdutor linear (7,5 MHz) por via transretal até a 8ª semana de gestação. A partir da 9ª e até a semana que antecedeu o parto, foi utilizado transdutor linear (7,5 MHz) por via transabdominal.

Após a identificação dos vasos pelo Doppler em cores, um volume de amostra (gate) teve seu tamanho ajustado ($2\pm 4\text{mm}$), dependendo do diâmetro dos vasos, e foi posicionado na porção central dos mesmos. Em seguida, foi acionado o Doppler pulsado para a obtenção do traçado espectral e índices vasculares. Um mínimo de três ondas foi utilizado na avaliação. Após a correção do ângulo de insonação (máximo de 60°) e com o traçado livre de artefatos, as imagens foram congeladas e realizou-se análise da morfologia das ondas, sendo obtidos a velocidade de pico sistólico (VPS), velocidade diastólica final (VDF) e índice de resistência ($IR = [VPS - VDF] / VPS$). Os índices foram determinados automaticamente (Feliciano *et al*. 2012).

Foram avaliados semanalmente os seguintes vasos: artérias uterina (n = 299), ovariana esquerda (n = 46) e direita (n = 64), umbilical (n = 311) e aorta fetal (n = 236) além do fluxo sanguíneo nos placentônios (n = 340).

A estatística foi realizada utilizando-se o software R (R® foundation for statistical computing, Austria) e de acordo com as recomendações de Chen e Peace (2010) e de Avriva e Watson (2013). Foi feita a análise de variância para medidas repetidas no tempo com a aproximação dos graus de liberdade de Satterthwaite, para tal foi utilizado o pacote lmerTest (Kuznetsova *et al.* 2016) e a comparação mínima significativa das médias foi obtida pelo teste de BH (Benjamini e Hochberg, 1995) sendo considerada significativa para o p ajustado menor que 0,05 (p.adj < 0,05).

Resultados

Das 30 ovelhas avaliadas, 22 gestações foram simples, sete duplas e uma tripla. Todas as gestações foram à termo, os partos ocorreram sem necessidade de intervenção e 36 borregos nasceram saudáveis.

O condicionamento contribuiu para que os animais aceitassem ser manipulados sem que isso lhes causasse grande estresse, o que foi fundamental para que as gestações ocorressem sem intercorrências. A utilização da via transabdominal a partir da 9ª semana foi fundamental devido à impossibilidade de se continuar as avaliações pela via transretal. Isso trouxe dificuldade na localização dos ovários, motivo pelo qual só há dados referentes à estas estruturas até a 8ª semana.

As imagens em corte transversal do feto facilitaram a avaliação da aorta fetal, localizada ventral à coluna vertebral e caracterizada como estrutura circular com presença de fluxo sanguíneo confirmada pelo Doppler colorido. Também foi possível localizá-la no corte transversal, porém, muitas vezes o equipamento encontrava dificuldade em formar o traçado Doppler espectral.

A Tabela 1 mostra o período durante o qual foi possível fazer a avaliação nas artérias propostas. Para todos os gráficos, considerar que letras diferentes demonstram (P<0,005).

Tabela 1. Períodos gestacionais nos quais foi possível avaliar ao Doppler espectral o fluxo sanguíneo de estruturas vasculares envolvidas na gestação de 30 ovelhas Santa Inês.

Artérias	Semanas Gestacionais
Ovariana	3 – 7
Uterina	3 – 21
Umbilical	4 – 21
Aorta Fetal	5 – 19
Placentônio	5 – 21

Aorta fetal

Para aorta fetal, a velocidade diastólica final apresentou valores menores nas semanas iniciais, com maiores registros sendo feitos nas últimas semanas de gestação (Figura 3), velocidade de pico sistólico com maiores valores obtidos nas semanas finais de gestação quando comparados às semanas iniciais (Figura 4) e houve uma redução nos valores do índice de resistência ao longo da gestação (Figura 5).

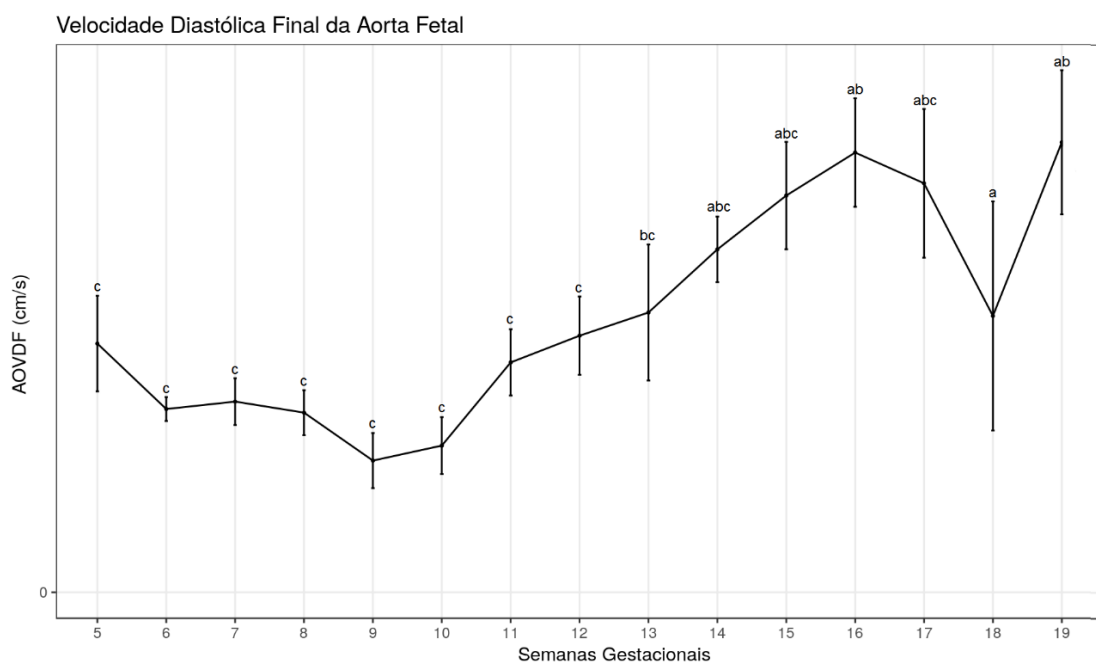


Figura 3. Gráfico da média $\pm$ erro padrão da velocidade diastólica final da artéria aorta de fetos ovinos da raça Santa Inês ao longo da gestação.

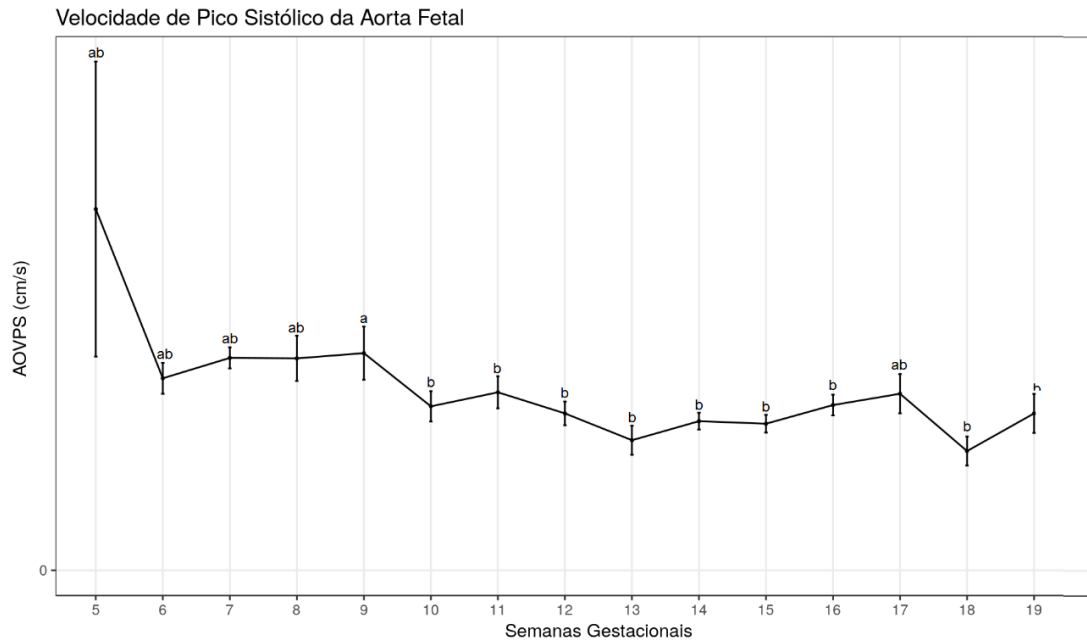


Figura 4. Gráfico da média $\pm$ erro padrão da velocidade de pico sistólico da artéria aorta de fetos ovinos da raça Santa Inês ao longo da gestação.

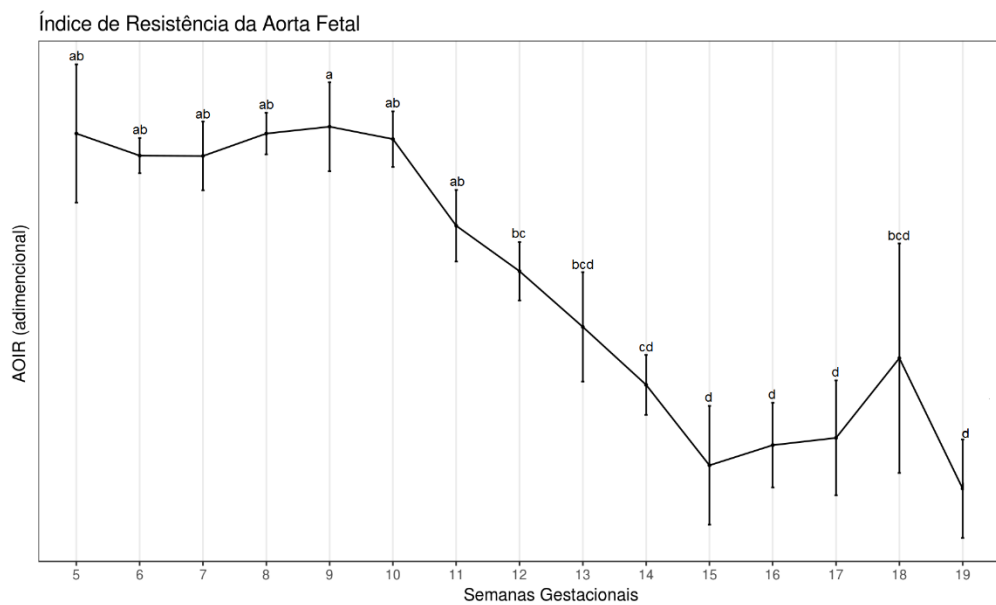


Figura 5. Gráfico da média $\pm$ erro padrão do índice de resistência da artéria aorta de fetos ovinos da raça Santa Inês ao longo da gestação

Ovários esquerdos

Para a velocidade diastólica final e velocidade de pico sistólico foi encontrada diferença apenas entre os valores obtidos nas semanas 4 e 6 (Figura 6). Já a análise

do índice de resistência, revelou redução no valor do índice no último momento de avaliação (Figura 7).

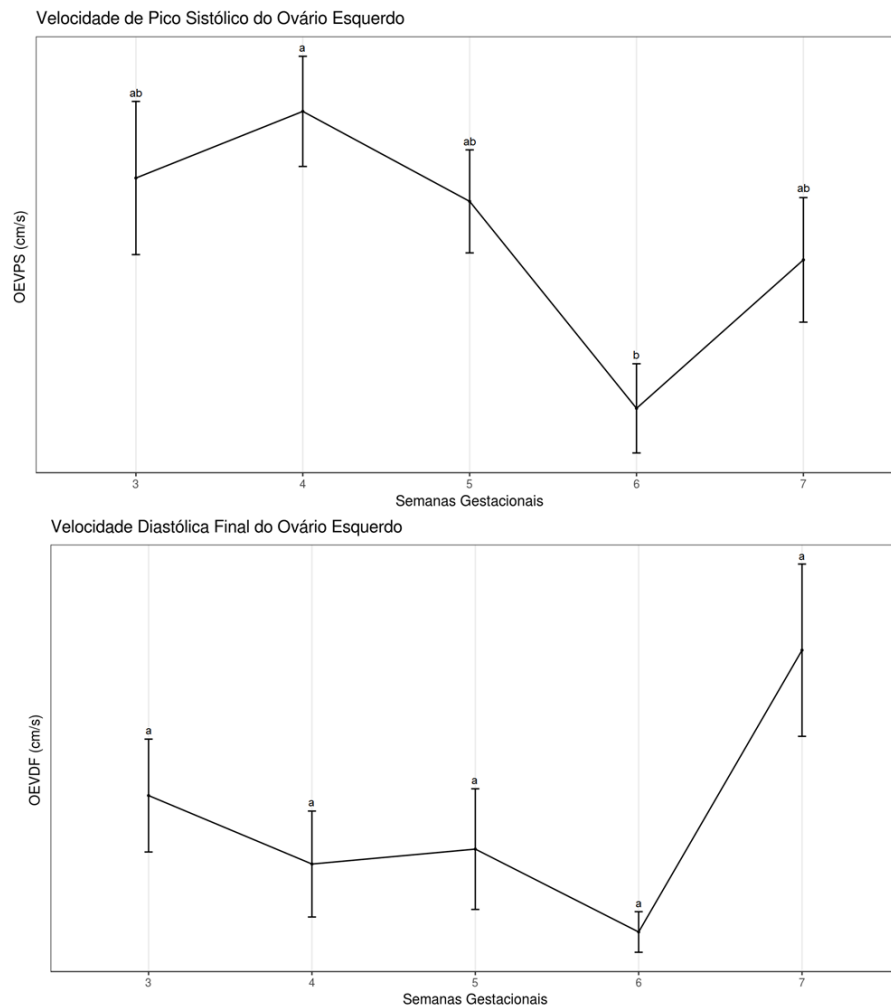


Figura 6. Gráficos mostrando médias $\pm$ erro padrão da velocidade diastólica final e velocidade de pico sistólico dos ovários esquerdos de 30 ovelhas Santa Inês ao longo da gestação.

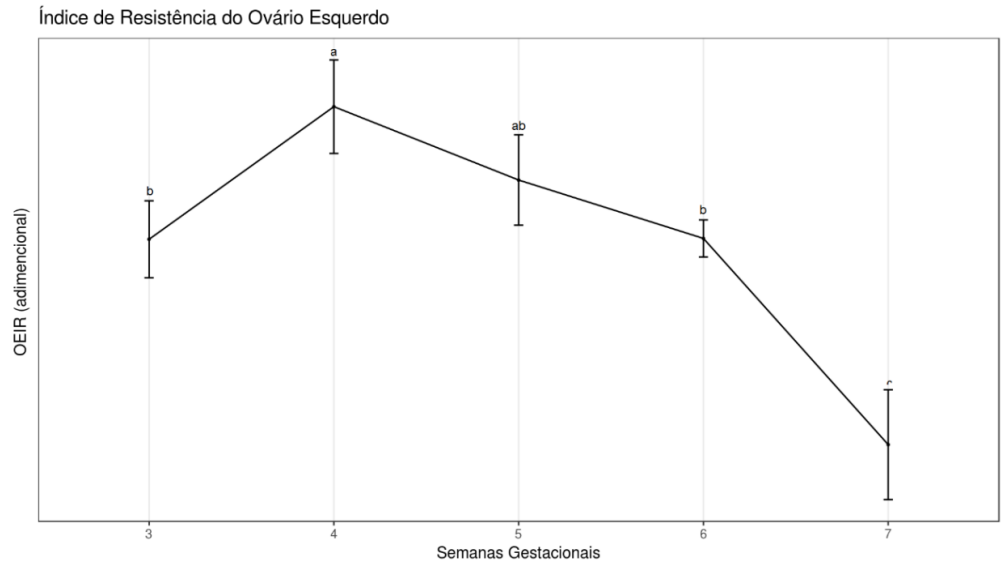


Figura 7. Gráfico mostrando média $\pm$ erro padrão do índice de resistência dos ovários esquerdos de 30 ovelhas Santa Inês ao longo da gestação.

Ovários direitos

Não houve diferença estatística para as variáveis estudadas (Figura 8).

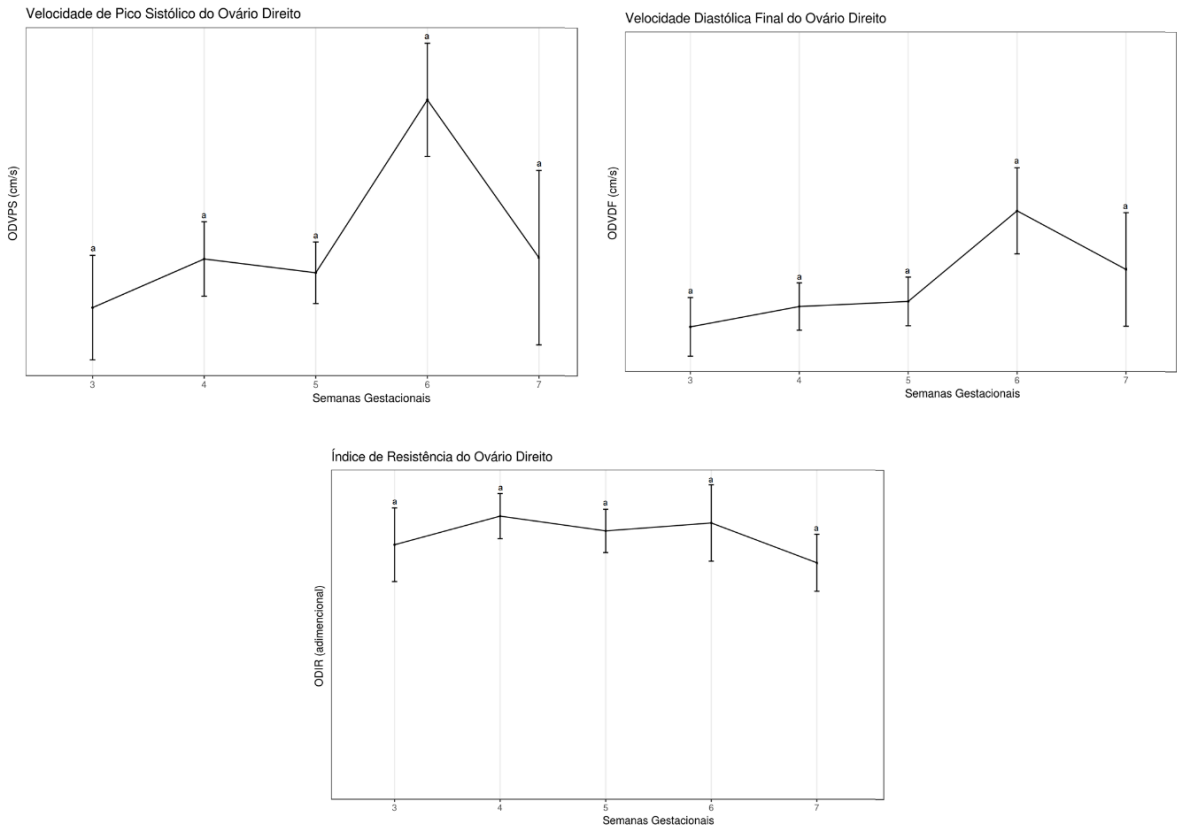


Figura 8. Gráficos mostrando médias $\pm$ erro padrão da velocidade diastólica final, velocidade de pico sistólico e índice de resistência dos ovários direitos de 30 ovelhas Santa Inês ao longo da gestação.

Artéria uterina

A velocidade diastólica final e a velocidade de pico sistólico da artéria uterina não apresentaram variação significativa ao longo da gestação ($P < 0,055$) (Figura 9). Já o índice de resistência apresentou valores maiores nas semanas iniciais com redução acentuada na última semana de gestação (Figura 10).

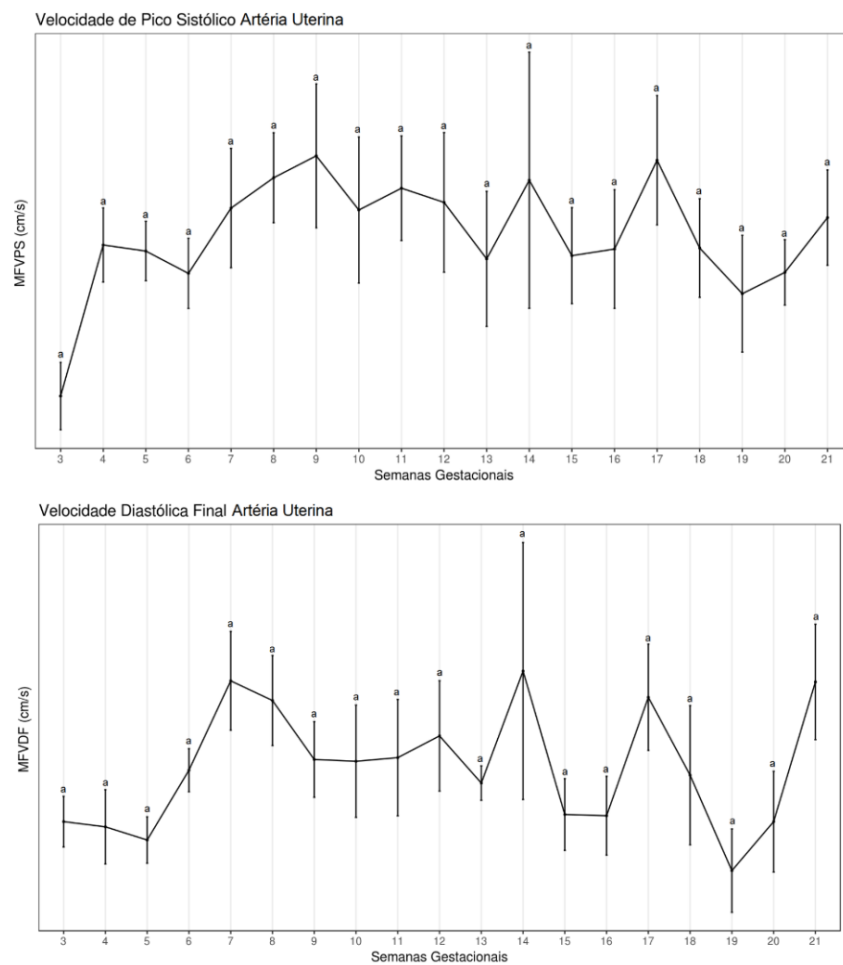


Figura 9. Gráficos mostrando médias $\pm$ erro padrão da velocidade diastólica final e do pico de velocidade sistólica da artéria uterina de 30 ovelhas Santa Inês ao longo da gestação.

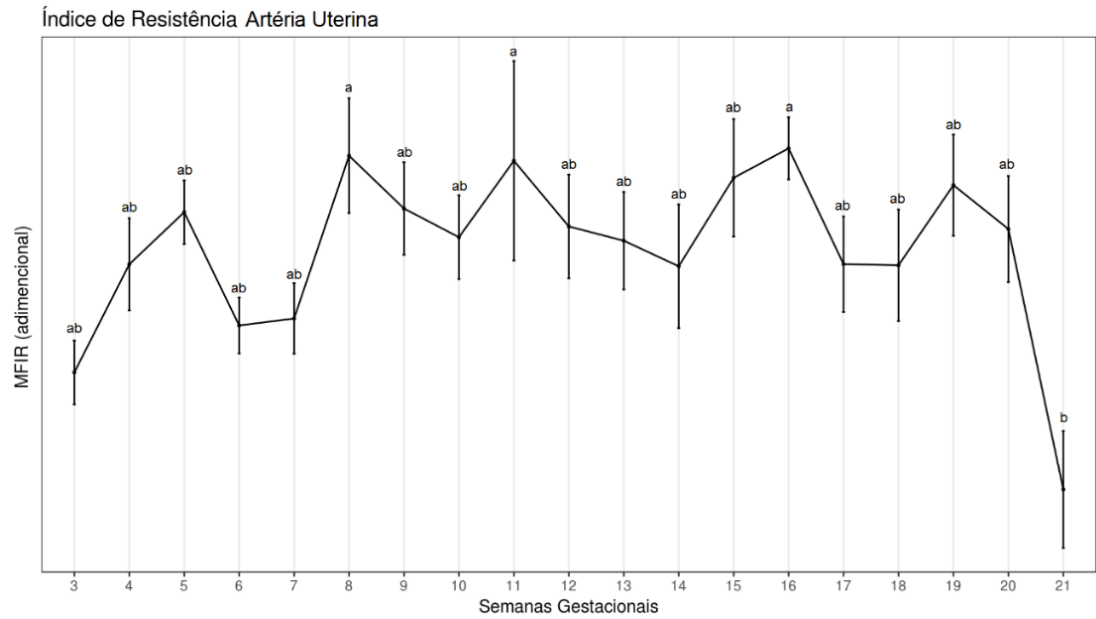


Figura 10. Gráfico da média $\pm$ erro padrão do índice de resistência da artéria uterina de 30 ovelhas Santa Inês ao longo da gestação.

Placentônios

A velocidade diastólica final e a velocidade de pico sistólico apresentaram oscilações dos valores nas semanas em que foi possível fazer as avaliações, não apresentando um padrão de comportamento (Figura 11). Observou-se redução no índice de resistência ($P < 0,001$), com acentuada redução a partir da 14ª semana (Figura 12).

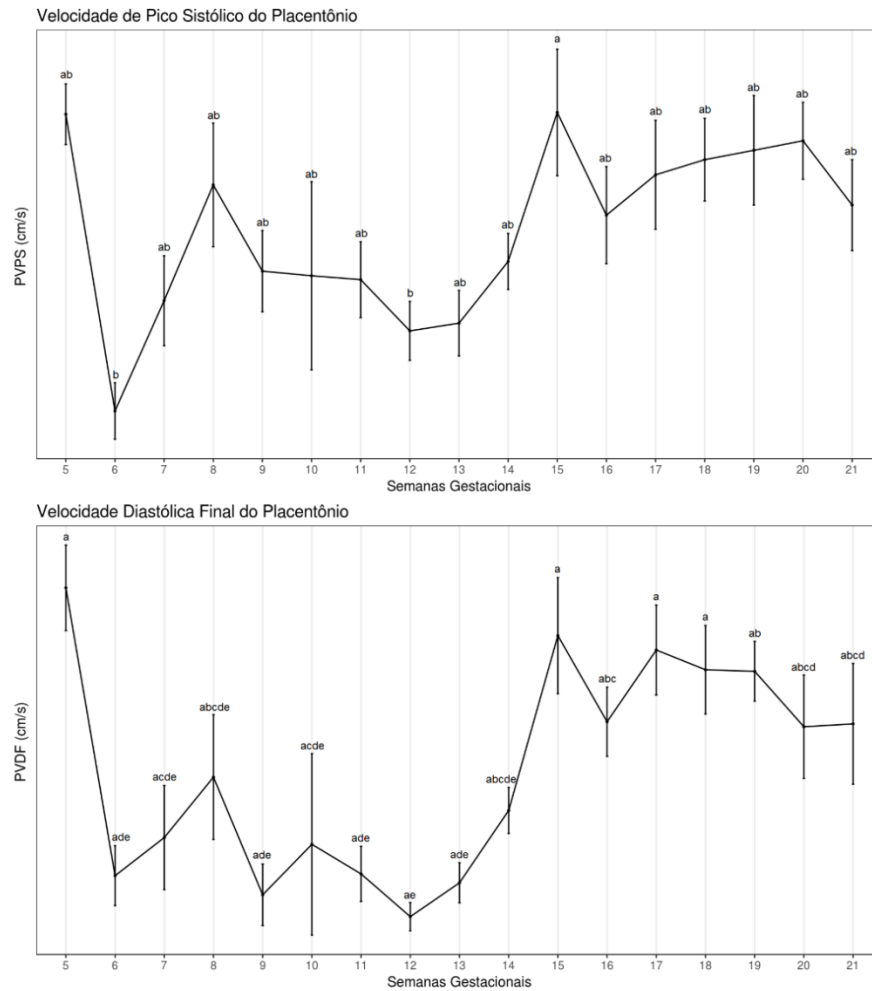


Figura 11. Gráfico da média $\pm$ erro padrão da velocidade diastólica final, velocidade de pico sistólico e índice de resistência de placentônios de 30 ovelhas Santa Inês durante a gestação.

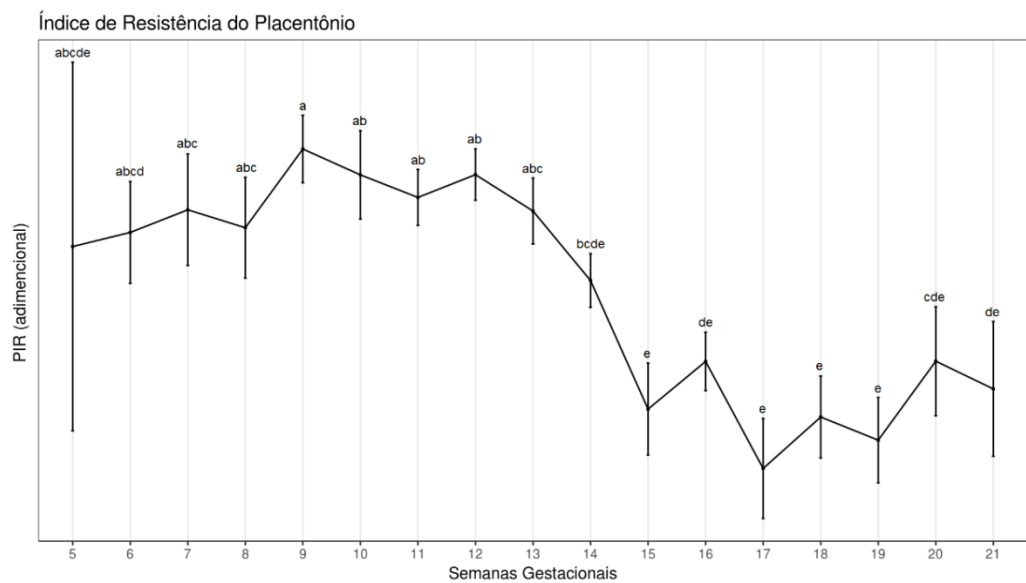


Figura 12. Gráfico da média $\pm$ erro padrão do índice de resistência de placentônios de 30 ovelhas Santa Inês durante a gestação.

Artéria umbilical

Foi observado aumento da velocidade diastólica final com o avanço da gestação ($P < 0,001$). Para a velocidade de pico sistólico não houve diferença significativa ($P < 0,1$) (Figura 13). O índice de resistência apresentou diferença significativa ($P < 0,001$) tendo sido registrados os maiores valores nas semanas iniciais, com evidente redução a partir da 10ª semana (Figura 14).

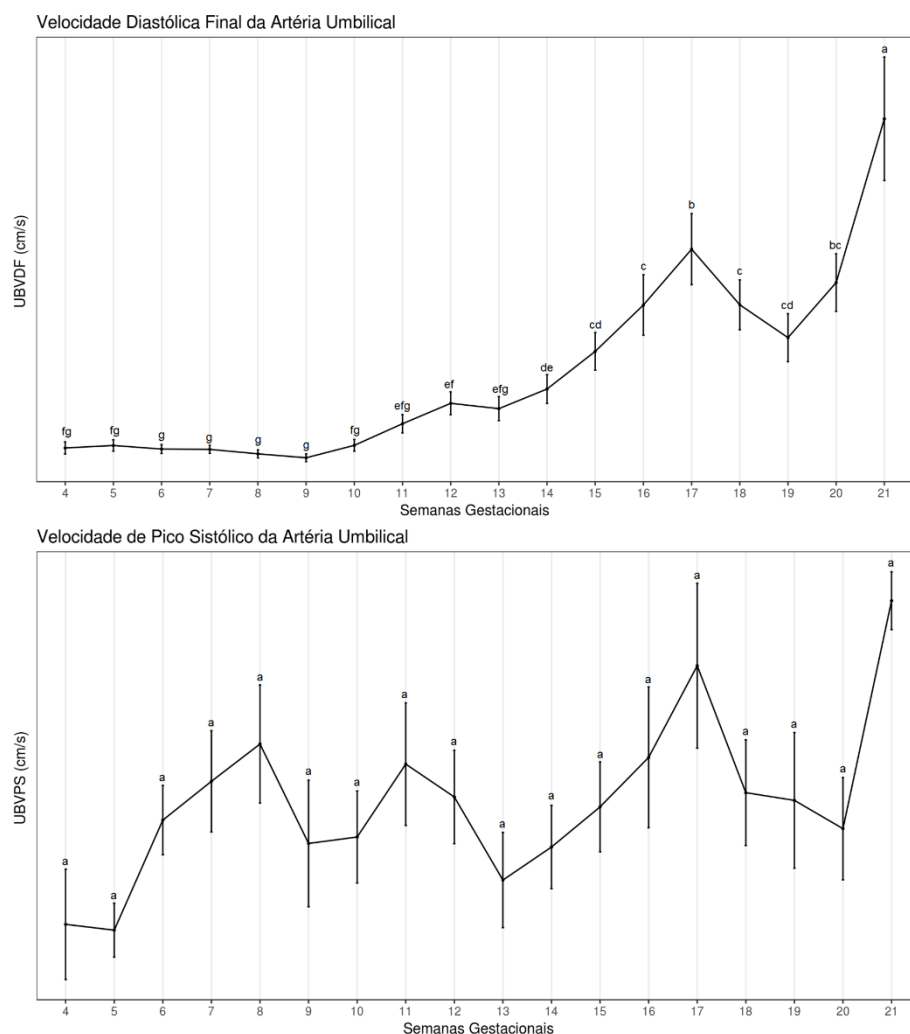


Figura 13. Gráfico da média $\pm$ erro padrão da velocidade de pico sistólico e velocidade diastólica final da artéria umbilical em fetos ovinos da raça Santa Inês medido por meio da ultrassonografia Doppler.

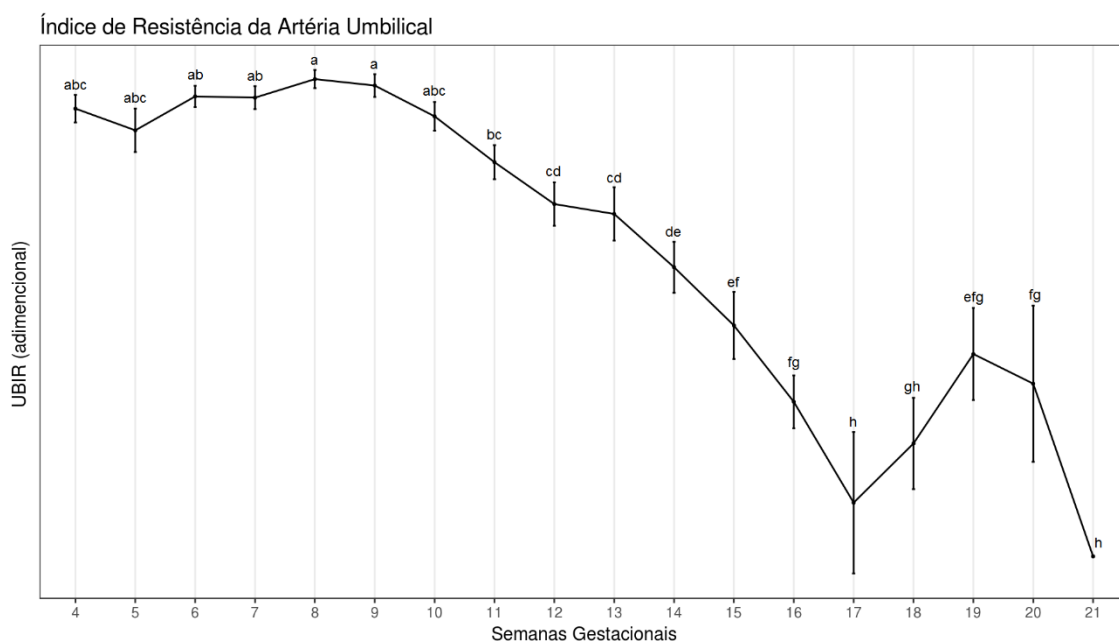


Figura 14. Gráfico de médias $\pm$ erro padrão do índice de resistência da artéria umbilical em fetos ovinos da raça Santa Inês medido por meio da ultrassonografia Doppler.

Discussão

Como observado por Reynolds *et al.* (1986), as alterações no fluxo sanguíneo observadas no presente estudo são esperadas e decorrem de modificações fisiológicas nos vasos sanguíneos relacionadas ao processo gestacional devido à crescente demanda nutricional dos fetos e crescimento placentário. As alterações envolvem incremento no volume sanguíneo e redução do índice de resistência e também são consequência do aumento do diâmetro dos vasos (Ousey *et al.* 2012). Índices de resistência elevados estariam relacionados a retardo no crescimento fetal em mulheres (Ogueh *et al.* 2011).

Existem poucos trabalhos que avaliam os índices vasculares em ovelhas durante a gestação. Os de Elmetwally, Rohn e Meinecke-Tillmann (2016) e Beltrame *et al.* (2017) são talvez os únicos já publicados com esse intuito. Esses autores avaliaram o fluxo sanguíneo na artéria uterina, porém, falta informação a respeito de outros vasos relacionados à gestação como artéria umbilical, artéria aorta fetal, artéria ovariana e circulação sanguínea nos placentônios. O conhecimento a respeito do fluxo sanguíneo nesses vasos pode contribuir para um entendimento mais completo acerca

da hemodinâmica gestacional fisiológica em ovelhas, o que confere singular importância para este estudo e seus resultados.

Em relação à artéria uterina, não foi identificada diferença para VPS e VDF. Houve apenas redução no índice de resistência na última semana gestacional. Beltrame *et al.* (2017) perceberam aumento da velocidade de pico sistólico e da velocidade diastólica final e redução nos valores do índice de resistência. A artéria uterina foi avaliada em nosso estudo utilizando-se a via transretal até a 8ª semana de gestação, a partir daí foi utilizada a via transabdominal. No período em que a via utilizada coincide entre os dois trabalhos (até a 8ª semana) os autores citados também não observaram diferença significativa nos índices avaliados.

Elmetwally, Rohn e Meinecke-Tillmann (2016) utilizaram a via transretal até a 14ª semana gestacional e após esse período, a via transabdominal, metodologia semelhante à utilizada neste estudo e encontraram redução no índice de resistência e aumento da velocidade de pico sistólico ao longo da gestação. As alterações parecem ser mais evidentes a partir da 6ª semana gestacional, sendo que a velocidade de pico sistólico apresentou aumento significativo na 8ª semana. Essas mudanças são explicadas pelo crescimento do feto e desenvolvimento placentário, que aumentam a necessidade de um maior aporte sanguíneo (Fowden *et al.* 2006).

A redução no índice de resistência encontrada neste estudo está de acordo com resultados encontrados pelos autores supracitados e considerando-se as alterações fisiológicas esperadas, foi a única variável que refletiu o que se espera como consequência das adaptações necessárias ao desenvolvimento normal da gestação e o fato de a redução do índice ser acentuada na última semana, pode indicar que o IR tem relação com a proximidade do parto.

No estudo da artéria umbilical, com exceção da velocidade de pico sistólico, as alterações observadas na velocidade diastólica final e no índice de resistência são condizentes com as observadas por Beltrame *et al.* (2017) e Elmetwally, Rohn e Meinecke-Tillmann (2016) na artéria uterina e são explicadas pela crescente necessidade de um maior aporte sanguíneo para o feto em desenvolvimento.

Como relatado por Riesen *et al.* (2002), o aumento na velocidade diastólica tem como consequência o aumento do fluxo sanguíneo e redução do índice de resistência. O que também se aplica à artéria umbilical segundo Serin *et al.* (2010). Estes autores

também relatam que encontraram redução acentuada no índice de resistência a partir do 85º dia de gestação (13ª semana) em cabras. O mesmo foi observado neste estudo (Figura 14). Também relatam que um segundo momento de redução do índice acontece no dia 130 (19ª semana gestacional). O mesmo só foi observado neste estudo na última semana de gestação e essa redução pode estar relacionada à proximidade do parto, como parece ocorrer em cadelas segundo (Giannico *et al.* 2015).

Em Medicina Humana o fluxo sanguíneo na aorta fetal vem sendo estudado, pelo menos, desde os anos 80. Foi reportado que a ausência de fluxo diastólico na aorta fetal está relacionada à retardo no desenvolvimento fetal, além de estar relacionada à predição de doenças nos neonatos (Hackett *et al.* 1987). O fluxo sanguíneo na aorta fetal também foi avaliado em mulheres com hipertensão e foram observadas alterações na velocidade diastólica final e em alguns pacientes, na velocidade de pico sistólico, que podem ser relacionadas a este problema (Cameron *et al.* 1988).

Neste estudo foram observados, com o avanço da gestação, aumento da velocidade diastólica final, redução do índice de resistência e da velocidade de pico sistólico. As alterações no índice de resistência e na velocidade diastólica final são um indício de que o fluxo sanguíneo está sendo facilitado, isso pode significar que o feto se torna cada vez menos dependente da circulação materna e a aorta fetal passa a assumir importância cada vez maior na circulação sanguínea fetal.

Como relatado por Reynolds *et al.* (2005) há aumento da vascularização placentária ao longo da gestação em ovinos devido a aumentos tanto no número quanto na densidade superficial dos capilares, particularmente na porção fetal dos placentônios. Os autores também apontam que essas mudanças são acompanhadas por um aumento exponencial no fluxo sanguíneo umbilical e uterino e pela expressão placentária aumentada do fator de crescimento vascular endotelial e seu receptor.

A restrição do fluxo sanguíneo nos cotilédones, que resulta em aumento de resistência, causou alterações no fluxo sanguíneo da artéria umbilical em ovelhas (Adamson *et al.* 1990). Estes autores sugerem que existe alta correlação entre a circulação sanguínea da artéria umbilical e dos cotilédones, com o aumento da

resistência nos cotilédones, causando redução da velocidade diastólica, chegando a eliminar este índice da onda do cordão umbilical.

Neste estudo foi observada redução do índice de resistência nos placentônios e aumento da velocidade diastólica na artéria umbilical. Como foram avaliadas somente gestações normais e esse resultado difere do encontrado pelos autores supracitados, que induziram o aumento de resistência nos cotilédones, sugere-se que existe correlação entre a circulação sanguínea nesses vasos. Também, a redução da resistência nos vasos dos placentônios pode ser uma resposta à maior necessidade de troca sanguínea entre ovelha e feto, dado o acelerado ritmo de desenvolvimento deste no terço final de gestação.

Neste estudo o período de detecção dos ovários foi limitado (Figuras 6 e 7). Isso se deu pela crescente dificuldade de localização dos ovários devido ao aumento de tamanho do útero e do feto. De fato, os ovários somente foram detectados até a 7ª semana gestacional, enquanto as avaliações foram feitas pela via transretal (até a 8ª semana). Também não houve relevância estatística nos resultados encontrados.

Conclusão

O estudo do fluxo sanguíneo em vasos envolvidos na gestação de ovelhas, além da artéria uterina, e com frequência semanal foi importante para que se obtivesse um quadro mais completo das alterações hemodinâmicas decorrentes desse processo. Espera-se que os resultados obtidos contribuam para um entendimento mais amplo acerca das mudanças hemodinâmicas decorrentes da gestação.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo pela concessão de bolsa de estudo (2014/15422-0).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

Referências Bibliográficas

- Acharya G, Sitras V, Erkinaro T, Makikallio K, Kavasmaa T, Pakkila M, Huhta JC, Rasanen J.** Experimental validation of uterine artery volume blood flow measurement by Doppler ultrasonography in pregnant sheep. *Ultrasound Obstet Gynecol*, v.29, p.401–406, 2007.
- Adamson, SL, Morrow, R.J, Langille, BL, Bull SB, Ritchie JWK.** Site-dependent effects of increases in placental vascular resistance on the umbilical arterial velocity waveform in fetal sheep. *Ultrasound in med & boi*, v.16, n.1, p.19-27, 1990.
- Barber FE, Baker DW, Nation AW, Strandness DE, Reid JM.** Ultrasonic duplex echo-Doppler scanner. *IEEE Trans on Biomed Eng*, v.21, p.109–113, 1974.
- Beltrame RT, Covre C, Littig LB, Martins AB, Quirino CR, Bartholazzi junior A, Costa RLD.** Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in ewes during pregnancy. *Therio*. (2017), doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.12.026.
- Blanco PG, Arias DO, Gobello C.** Doppler ultrasound in canine pregnancy. *Journal of Ultrasound in Medicine, Laurel*, v.27, p.1745–50, 2008.
- Bragança GM, Balaro MFA, Fonseca JF, Pinto PHN, Rosa RM, Ribeiro LS, Almeida MS, Fabjan JMGS, Garcia AR, Brandao FZ.** Doppler ultrasound in the diagnosis of early pregnancy in sheep. *Anim Rep*, v.13, n.3, p.587, Jul./Sept. 2016.
- Cameron AD, Nicholson SF, Nimrod CA.** Doppler waveforms in the fetal aorta and umbilical artery in patients with hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, v.158 n.2, p.338-345, 1988.
- Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan H, Wang Y, Toro L, Stefani E.** Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circulation Research, Baltimore*, v.96, p.1208–16, 2005.
- Elmetwally M, Bollwein H.** Uterine blood flow in sheep and goats during the periparturient period assessed by transrectal Doppler sonography. *Anim Rep Scie* v.176, p.32-30, 2016.
- Elmetwally M, Rohn K, Meinecke-Tillmann S.** Noninvasive color Doppler sonography of uterine blood flow throughout pregnancy in sheep and goats. *Theriogenology*, v.85, p.1070-1079, 2016.
- Molina-Font JA.** Nutrition and fetal growth. *Early Hum Dev*, v. 53 p.51-60, 1998.

Fowden AL, Ward JW, Wooding FPB, Forhead AJ, Constancia M. Programming placental nutrient transport capacity. *J Physiol*, v.572 n.1 p.5-15, 2006.

Feliciano MAR, Vicente WRR, Silva MAM. Conventional and Doppler ultrasound for the differentiation of benign and malignant canine mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice*, n. 53, p. 332–337, 2012.

Feliciano MAR, Oliveira MEF, Vicente WRR. Ultrassonografia na Reprodução Animal. *MedVet*, 1ª ed, São Paulo, p.4 e 145, 2013.

Giannico AT, Gil EMU, Garcia DAA, Froes TR. The use of Doppler evaluation of the canine umbilical artery in prediction of delivery time and fetal distress. *Animal Reproduction Science*, v.154, p.105-112, 2015.

Hackett GA, Campbell S, Gamsu H, Cohen-overbeek T, Pearce JMF. Doppler studies in the growth retarded fetus and prediction of neonatal necrotising enterocolitis, haemorrhage,-and neonatal morbidity. *British Medical Journal*, v. 294, 1987.

Hafez ESE, Hafez B. Reproductive cycles. In: *Reproduction in farm animals*. Philadelphia: Lippincott williams & Wilkins, p. 55-67, 2000.

Hameed AB, Sklansky MS. Pregnancy: maternal and fetal heart disease. *Current Problems in Cardiology*, New York , v.32, p.419–94, 2007.

Jainudeen, MR, Hafez, ESE. Gestation, prenatal physiology, and parturition. In: Hafez, E.S.E., Hafez, B. *Reproduction in farm animals*. 7. ed. Philadelphia: Lippincott williams & wilkins, p. 140-155, 2000.

Khong TY. Placental vascular development and neonatal outcome. *Semin Neonatol* v. 9, p.255–263, 2004.

Conference Proceedings Souza, JMG. et al. (2007). Uso de protocolos curtos para indução de estro em ovelhas Santa Inês. In proceedings of the Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Accessible in: www.cbra.org.br/publicacoes.do. 2007.

Ogueh O, Clough A, Hancock M, Johnson MR. A longitudinal study of the control of renal and uterine hemodynamic changes of pregnancy. *Hypertens Pregnancy* v.30, p.243–59, 2011.

Ousey JC, Kolling M, Newton R, Wright M, Allen WR. Uterine haemodynamics in young and aged pregnant mares measured using Doppler ultrasonography. *Equine Vet J Suppl* p.15–21, 2012.

Reynolds LP, Ferrell CL, Robertson DA, Ford SP. Metabolism of the gravid uterus, fetus and utero-placenta at several stages of gestation in cows. *J Agric Sci*, v.106, p.437–44, 1986.

Reynolds LP, Borawicz PP, Vonnahme KA, Johnson ML, Grazul-Bilska AT, Wallace JM, Caton JS, Redmer DA. Animal models of placental angiogenesis. *Placenta*, v.26, p.689–708, 2005.

Riesen S, Schmid V, Gaschen L, Busato A, Lang J. Doppler measurement of splanchnic blood flow during digestion in unsedated normal dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, Raleigh, v. 43, n. 6, p. 554-560, 2002.

Sarafana S, Coelho R, Neves A, Trindade JC. Aspectos da imunologia da gravidez. *Acta Medica Portuguesa*, Lisboa, v.20, p.355-358, 2007.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A precocidade do diagnóstico gestacional é desejável por permitir adequações de manejo do rebanho. Apesar do desenvolvimento tecnológico, não há diferença relevante entre os resultados de pesquisas mais antigas e mais recentes com este objetivo. Podendo-se concluir que pode ser obtido aos 20 dias de gestação, quando é possível visibilizar líquido no interior do útero e embrião aderido à parede uterina. Também a viabilidade embrionária pode ser obtida nesse momento, com a observação de batimentos cardíacos.

Foi possível visibilizar placentônios, rins, pulmões, além de batimentos cardíacos, e a diferenciação entre cabeça, tórax e abdome antes do estipulado pela literatura. Também destacam-se o diâmetro abdominal e a largura do coração, que podem ser mensurados durante a maior parte da gestação e tem alta correlação com o tempo de gestação. A última, sendo descrita pela primeira vez neste estudo. A frequência cardíaca merece destaque já que valores inferiores a 144 bat/min podem indicar que a gestação se encontra na última semana. Até o momento não se tem conhecimento de pesquisas relacionando essa variável ao tempo de gestação.

Com o modo Doppler, foi possível obter um panorama das alterações hemodinâmicas que ocorrem como consequência do desenvolvimento gestacional, principalmente pela necessidade de maior aporte sanguíneo necessário ao bom desenvolvimento fetal. Os resultados obtidos acrescentam informação relevante para o entendimento da circulação sanguínea nos vasos mais relevantes para o processo gestacional.

Com maior conhecimento acerca do desenvolvimento fetal fisiológico ovino, têm-se a base de comparação que torna possível diagnosticar anormalidades do desenvolvimento. Os achados obtidos nesta pesquisa podem auxiliar o Médico Veterinário de campo na rotina obstétrica. Constituem-se em ferramentas práticas para a avaliação da gestação e do desenvolvimento embrionário/fetal em ovelhas, também é relevante o fato desses animais serem usados como modelo experimental para a medicina humana, fato que torna importante o conhecimento acerca da fisiologia da gestação em ovelhas.