

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA E ELASTOGRÁFICA
DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM FETOS CANINOS
BRAQUICEFÁLICOS

Letícia Pavan

Médica Veterinária

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA E ELASTOGRÁFICA
DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM FETOS CANINOS
BRAQUICEFÁLICOS**

Discente: Letícia Pavan

Orientador: Prof. Dr. Marcus Antônio Rossi Feliciano

Coorientadora: Dra. Luciana Cristina Padilha Nakaghi

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área: Reprodução Animal

2019

P337a Pavan, Leticia
Avaliação ultrassonográfica e elastográfica do sistema nervoso central em fetos caninos braquicefálicos / Leticia Pavan. --
Jaboticabal, 2019
69 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Marcus Antônio Rossi Feliciano
Coorientadora: Luciana Cristina Padilha-Nakaghi

1. Medicina veterinária. 2. Cão. 3. Ultrassonografia veterinária. 4.
Prenhez. 5. Feto. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

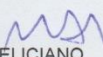
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRAFICA E ELASTOGRAFICA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM FETOS CANINOS BRAQUICEFÁLICOS

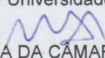
AUTORA: LETÍCIA PAVAN

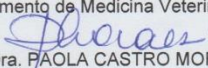
ORIENTADOR: MARCUS ANTÔNIO ROSSI FELICIANO

COORIENTADORA: LUCIANA CRISTINA PADILHA NAKAGHI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MARCUS ANTÔNIO ROSSI FELICIANO
Setor de Diagnóstico por Imagem / Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria/RS


Prof. Dr. FELIPE FARIAS PEREIRA DA CÂMARA BARROS (VIDEOCONFERÊNCIA)
Departamento de Medicina Veterinária e Cirurgia Veterinária-UFRRJ / Seropédica/RJ


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

Jaboticabal, 18 de dezembro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Letícia Pavan – nascida em Campinas (SP), no dia 03 de outubro de 1992. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/Unesp, Campus de Jaboticabal (2011-2015). Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2014-2015). Fez Residência em Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária pelo Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária e Saúde, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/Unesp, Campus de Jaboticabal (2016-2018). Atualmente é mestranda do programa de Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal, na mesma instituição, com linha de pesquisa em ultrassonografia de pequenos animais, sob orientação do Prof. Dr. Marcus Antônio Rossi Feliciano e coorientação da Dra. Luciana Cristina Padilha Nakaghi.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a oportunidade de ingressar na FCAV-Unesp e viver em Jaboticabal durante 9 anos, onde eu aprendi muito e conheci pessoas maravilhosas cujas amizades vou levar comigo para a vida toda.

Ao meu orientador, Marcus Antônio Rossi Feliciano, por me incentivar desde a graduação a investir no meu crescimento profissional e na minha especialização. Obrigada por ter me acompanhado nessa caminhada e por todas as oportunidades que me deu ao longo desses anos.

À minha coorientadora, Luciana Cristina Padilha Nakaghi, que sempre se colocou à disposição para o que eu precisasse e foi parte fundamental na fase de redação do trabalho. Sou extremamente grata pela oportunidade de conhecê-la melhor.

Ao Ricardo Uscategui que, apesar de não ter sido oficialmente meu coorientador, na prática nunca deixou de exercer tal papel, contribuindo muito com o meu trabalho do começo (me apresentando o canil) ao fim.

À minha equipe multifuncional preferida, Ma, Pri e Migs. Elas formaram o nosso quarteto e foram essenciais para a execução do experimento.

À minha amiga Marjury, que me ensinou praticamente tudo o que eu sei sobre ultrassonografia. Agradeço pela paciência e pelo carinho que sempre teve ao me ajudar durante os exames!

À minha amiga Priscila, por se preocupar em cuidar das pessoas que estão ao seu redor. Obrigada por estar sempre pronta a me ajudar em qualquer situação.

À minha amiga Beatriz (Migalha), que esteve presente durante todo experimento, nos exames e nas cesarianas, e ainda se transformou na anestesista oficial das cirurgias permitindo que o trabalho fosse concluído com sucesso! Obrigada pela parceria desde a residência!

A todos os amigos da nossa “salinha”, que fazem parte do grupo de pós-graduandos da reprodução (Ana Paula, Mariana Kako, Marjury, Migalha, Priscila Silva, Renata, Cristhian, Priscila Del Águila, Victor, Luiz e Igor), pois eles me acolheram e compartilharam de muitos momentos do meu dia-a-dia. Sentirei falta dessa rotina.

Aos funcionários Edson e Hugo do departamento de Reprodução Animal.

Aos funcionários do Hospital Veterinário, em especial ao Arnildo, Marcelo, Josy, Isildinha e Ana Paula.

Às residentes da anestesiologia, Pâmela e Laura, por se disponibilizarem a nos ajudar com as cesáreas.

Às residentes da obstetrícia, Samara, Camila, Nathalia e Marina, por dividirem o setor conosco quando foi preciso e por compartilharem alguns momentos ao longo desses dois anos.

Aos meus pais, por sempre priorizarem a minha educação e por me apoiarem em todas as decisões. Eles são a minha base, o colo e a casa para onde eu corro quando estou precisando de momentos de renovação, equilíbrio e tranquilidade. Serei eternamente grata por tudo que fizeram e fazem por mim!

Às minhas irmãs, Patrícia e Bárbara, quem eu amo muito e sinto muita saudade de ter no meu dia-a-dia. Apesar da distância, estão sempre presentes torcendo pelo meu sucesso, assim como eu torço pelo delas.

Ao meu namorado, pela compreensão nos momentos em que precisei estar ausente enquanto me dedicava ao projeto, e por valorizar o meu trabalho. Obrigada pelo companheirismo!

Ao Sérgio, e ao Canil Laffranchi, pela parceria e pela confiança depositada no nosso grupo. Sem a contribuição dele seria impossível executar o projeto, principalmente de forma tão tranquila e prazerosa. Obrigada pela colaboração e também pela amizade!

A todas as matrizes e seus respectivos filhotes que fizeram parte do projeto. Os animais são nossa motivação e muitas vezes nos dão motivos para sorrir em dias difíceis... quando se trata do momento mágico que é o nascimento, essa alegria se multiplica! Não poderia ter escolhido uma linha de pesquisa mais gratificante!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de pesquisa e bolsa produtividade (processos 131535/2018-8 e 309199/2017-4)

À Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio temático (processo 2017/14957-6) e pelo EMU FAPESP (processo 2019/09197-8).

A Jair Matos e Siemens Healthineers pela assistência técnica.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	2
2.1 Embriologia do SNC.....	3
2.2 Ultrassonografia gestacional.....	3
2.3 Elastografia.....	6
3. Referências.....	7
CAPÍTULO 2 – Translucência nuchal como técnica diagnóstica em fetos caninos.....	11
Resumo.....	11
Introdução.....	12
Material e Métodos.....	14
Resultados.....	16
Discussão.....	18
Conclusão.....	20
Referências.....	21
Figuras.....	24
CAPÍTULO 3 – Ultrassonografia modo-B e elastografia do cérebro e cerebelo de fetos caninos da raça Bulldog Inglês.....	26
Resumo.....	26
Introdução.....	27
Material e Métodos.....	28
Resultados.....	32
Discussão.....	39
Conclusão.....	42
Referências.....	43
ANEXOS.....	47

ANEXO A.....	48
APÊNDICES.....	53
APÊNDICE A.....	54
APÊNDICE B.....	57



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação ultrassonográfica e elastográfica do sistema nervoso central em fetos caninos braquicefálicos**", protocolo nº 008364/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcus Antônio Rossi Feliciano, 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 05 de julho de 2018.

Vigência do Projeto	16/07/2018 a 29/02/2020
Espécie / Linhagem	Canina / Bulldog Inglês
Nº de animais	20
Peso / Idade	20 a 30 Kg / 2 a 5 anos
Sexo	Fêmea
Origem	Canil Laffranchi - Jaboticabal

Jaboticabal, 05 de julho de 2018.

Fabiana Pilarski
Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Vila de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, km CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 19 3209 7100 www.fca.unesp.br

AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA E ELASTOGRÁFICA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM FETOS CANINOS BRAQUICEFÁLICOS

RESUMO – Os objetivos deste estudo foram avaliar as características ultrassonográficas (modo-B e da elastografia) das estruturas do sistema nervoso central (SNC) de fetos caninos, como método complementar para predizer a idade gestacional, avaliar o desenvolvimento dos conceitos, estabelecer padrões de normalidade e auxiliar no diagnóstico de anormalidades gestacionais. Foram utilizadas 26 cadelas braquicefálicas, da raça Bulldog Inglês, com idade entre um e quatro anos e meio. Os exames ultrassonográficos foram realizados em três momentos da gestação, aos 34, 49 e 60 dias, com o aparelho ACUSON S2000/SIEMENS e transdutor multifrequencial matricial e linear de 9,0 MHz. Foram avaliados três fetos de cada fêmea. Verificou-se a presença da massa cerebral fetal, seu formato em corte transversal, ecotextura e ecogenicidade, presença e mensuração da translucência nuchal (TN). O cerebelo foi avaliado em corte transversal, verificando-se seu formato, ecotextura, ecogenicidade e comprimento do seu eixo maior. A elastografia foi aplicada ao tecido fetal cerebral e cerebelar obtendo-se velocidades médias de cisalhamento (m/s) e elastogramas. O delineamento experimental foi em blocos casualizado (cadelas), com parcelas subdivididas no tempo (dias gestacionais), e a análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas no tempo. Das 26 ninhadas estudadas, 18 tiveram somente fetos saudáveis, 4 apresentaram fetos com anasarca, 3 apresentaram fetos com defeitos da parede abdominal e 1 apresentou os dois tipos de alteração. A TN foi maior ($P=0,0249$) nos fetos das cadelas que apresentaram anasarcas na ninhada ($1,8\pm0,77$ mm) em relação às ninhadas normais ($1,4\pm0,48$ mm), e de acordo com a análise ROC o valor de corte para a presença de anasarca foi de $TN>1,45$ mm (sensibilidade=61,54%, especificidade=70,18%). O cerebelo apresentou formato de “banana”, com bordas mais ecogênicas, ecotextura homogênea e hipoeoico em relação aos tecidos adjacentes. O diâmetro transversal cerebelar (DTC) no dia 60 foi maior que no dia 49 ($P=0,0001$). A rigidez tecidual do cerebelo foi maior aos 60 dias quando comparada com 49 dias ($P=0,0006$). A SWV da massa cerebral apresentou um aumento gradativo ($P=0,0001$) nos três momentos gestacionais avaliados e correlacionou-se positivamente com dias para o parto (DPP) ($P=0,0001$). De acordo com o elastograma, tanto o cérebro quanto o cerebelo tornaram-se mais rígidos com o avanço dos dias gestacionais. Conclui-se que a mensuração da espessura da TN no 34º dia gestacional apresentou potencial diagnóstico para o desenvolvimento de fetos com anasarca durante a gestação de cadelas. Com as características ultrassonográficas do cerebelo e da massa cerebral, a mensuração do DTC e a elastografia do sistema nervoso central foi possível acompanhar o desenvolvimento dos conceitos e estabelecer padrões de normalidade.

Palavras-chave: ARFI, cão, cerebelo, cérebro, translucência nuchal

ULTRASONOGRAPHIC AND ELASTOGRAPHIC EVALUATION OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN BRACHICEPHALIC CANINE FETUS

ABSTRACT – The objectives of this study were to evaluate the ultrasound (B-mode and elastography) characteristics of canine fetal central nervous system structures as complementary method to predict gestational age, to evaluate the development of the fetuses, to establish normality patterns and to assist in diagnosis of gestational abnormalities. Twenty-six brachycephalic female dogs of the English Bulldog breed, aged between one and four and a half years were used. Ultrasound examinations were performed at three gestational moments, at 34, 49 and 60 gestation days, with the ACUSON S2000 / SIEMENS device and a 9.0 MHz matrix and linear multifrequency transducer. Three fetuses of each female were evaluated. The presence of fetal brain mass, its cross-sectional shape, echotexture and echogenicity, presence and measurement of nuchal translucency (TN) were verified. The cerebellum was evaluated in cross-section, verifying its shape, echotexture, echogenicity and length of its major axis. Elastography was applied to the fetal brain and cerebellar tissue to obtain mean velocities and elastograms. The experimental design was randomized in blocks (bitches) with plots subdivided in time (gestational days) and statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) with repeated measures over time. Of the 26 litters studied, 18 had only healthy fetuses, 4 had fetuses with anasarca, 3 had fetuses with abdominal wall defects, and 1 had both types of alterations. The TN was higher ($P=0.0249$) in the fetuses of bitches that presented anasarcas in the litter (1.8 ± 0.77 mm) in relation to the normal litters (1.4 ± 0.48 mm), and according to ROC analysis the cohort value for the presence of anasarca was $TN > 1.45$ mm (sensitivity=61.54%, specificity=70.18). The cerebellum was “banana shaped”, with more echogenic edges, homogeneous and hypoechoic echotexture in relation to adjacent tissues. The transverse cerebellar diameter (TCD) on day 60 was greater than on day 49 ($P=0.0001$). Cerebellar tissue stiffness was higher at 60 days compared to 49 days ($P=0.0006$). Brain mass SWV showed a gradual increase ($P=0.0001$) in the three gestational moments evaluated and was positively correlated with days before parturition (DBP) ($P=0.0001$). According to the elastogram, both the brain and cerebellum became more rigid as gestational days progressed. In conclusion, the measurement of TN thickness on the 34th day of gestation demonstrated potential for diagnosis for the development of anasarca fetuses during bitches' gestation. The sonographic characteristics of the cerebellum and brain mass, the measurement of the TCD and the elastography of the central nervous system made it possible to verify the development of the concepts and to determine normality patterns.

Keywords: ARFI, dog, cerebellum, brain, nuchal translucency

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

Os primeiros estudos que utilizaram a ecobiometria cerebral em fetos caninos mediram a vesícula diencéfalo-telencefálica, uma porção do encéfalo, e correlacionaram-na com dias gestacionais (Beccaglia e Luvoni, 2004; Beccaglia et al., 2008). Mais tarde, por meio da ultrassonografia foi possível identificar, avaliar e acompanhar o desenvolvimento da massa cerebral e, a partir dessas análises, diagnosticar precocemente malformações fetais como a hidrocefalia (Feliciano et al., 2013). Com o desenvolvimento de aparelhos de ultrassom mais modernos e imagens de melhor qualidade e resolução, essa prática vem se tornando viável à rotina clínica na obstetrícia veterinária.

O desenvolvimento cerebral canino foi avaliado pela ressonância magnética durante o período neonatal e tanto o cérebro quanto o cerebelo apresentaram diferenças marcantes quando comparados com essas mesmas estruturas de animais adultos (Gross et al., 2010). Apesar da escassa literatura, pode-se inferir que essa evolução se inicie durante o período embrionário/fetal e que o exame ultrassonográfico possa fornecer informações relevantes, sendo uma técnica mais acessível.

Em mulheres, é realizada no primeiro trimestre da gestação a mensuração ultrassonográfica da translucência nuchal (TN). Tal avaliação é um método eficaz na triagem da trissomia 21 e outras síndromes, estabelecendo se é necessário realizar exames mais invasivos (amniocentese e amostragem de vilosidades coriônicas), além de sugerir a interrupção da gestação (Nicolaidis et al., 2002). Por esses motivos, pode ser considerado o exame mais importante e esperado do pré-natal em humanos, entretanto ainda não foi descrito em cães. Outra medida ultrassonográfica aplicada em fetos humanos, mas que não é executada em cães, é o diâmetro transversal cerebelar que, dentre suas finalidades, permite estimar a idade gestacional com maior precisão quando comparada aos demais parâmetros biométricos (Holanda-Filho et al., 2011).

Também em humanos, a técnica elastográfica do *Virtual touch tissue quantification* (VTTQ) aplicada em tecidos fetais foi capaz de detectar anormalidades no desenvolvimento do parênquima cerebral (Zheng et al., 2016). Já em babuínos, sugeriu-se que possibilitaria estimar a maturação de órgãos fetais, entre eles o cérebro (Quarello et al., 2015). Em caninos, não foram encontrados estudos descrevendo a utilização desta técnica na avaliação pré-natal do sistema nervoso central (SNC) dos conceptos. Espera-se que a avaliação elastográfica dos parênquimas cerebral e cerebelar seja uma ferramenta complementar ao acompanhamento gestacional ultrassonográfico como mais um método de determinação de maturação fetal e proximidade do parto. Além disso, estabelecendo padrões de normalidade para a técnica, será possível diagnosticar precocemente alterações nessas estruturas do SNC e assim sugerir a viabilidade e/ou os riscos gestacionais.

Dessa forma, nota-se escassez de estudos em cadelas gestantes que utilizem tanto técnicas mais recentes de ultrassonografia quanto avaliações já bem estabelecidas em humanos, sendo estes métodos não invasivos e capazes de auxiliar na determinação do momento do parto, no diagnóstico de malformações e no acompanhamento do desenvolvimento fetal.

O objetivo principal do presente estudo foi avaliar as características ultrassonográficas (modo-B e elastografia) das estruturas do sistema nervoso de fetos caninos como métodos complementares para prever a idade gestacional, acompanhar o desenvolvimento dos conceptos, estabelecer padrões de normalidade e auxiliar no diagnóstico de anormalidades gestacionais. Os objetivos específicos foram: avaliar as características ecotexturais e ecogenicidade das estruturas cerebrais e cerebelar dos fetos caninos durante a gestação; determinar valores biométricos do sistema nervoso central e construir fórmulas que auxiliem na predição da idade gestacional ultrassonográfica mediante estes parâmetros; estabelecer padrões da rigidez cerebral e cerebelar por meio da elastografia *Acoustic Radiation Force Impulse* (ARFI) e correlacionar os achados com o desenvolvimento gestacional.

2. Revisão de Literatura

2.1 Embriologia do SNC

O SNC é formado pela medula espinhal e pelo encéfalo. O encéfalo localiza-se na cavidade craniana, fica envolto pelo líquido cerebrospinal e é dividido macroscopicamente em cérebro, cerebelo e tronco encefálico. Nos cães braquicefálicos os hemisférios cerebrais localizam-se nas partes frontal e parietal do crânio, mais superficialmente quando comparados aos mesaticefálicos. O cerebelo posiciona-se caudalmente ao cérebro e é composto pelos hemisférios cerebelares laterais e pelo vérmis, uma crista sagital mediana. Suas funções estão relacionadas ao equilíbrio e à coordenação dos músculos esqueléticos (König et al., 2016).

O sistema nervoso se origina da ectoderme durante o período embrionário, que nos cães se inicia com a implantação uterina, cerca de 19 dias após o pico do hormônio luteinizante (LH), e termina quando a organogênese se completa, aproximadamente no 35º dia. O desenvolvimento do embrião ocorre na direção cefalocaudal e a diferenciação anatômica é maior a partir do 30º dia após o pico de LH (Pretzer, 2008).

2.2 Ultrassonografia gestacional

A ultrassonografia é a ferramenta mais empregada no pré-natal de fêmeas caninas, pois permite diagnosticar precocemente a gestação, avaliar a viabilidade fetal e estimar a idade gestacional de forma eficaz e não invasiva (Nepomuceno et al., 2013).

Para acompanhar a viabilidade gestacional, a frequência cardíaca fetal é um dos principais parâmetros utilizados na rotina veterinária. Tal avaliação também permite indicar a proximidade do parto e determinar o momento de se realizar uma cesariana com maior segurança para a sobrevivência da ninhada, evitando intervenções cirúrgicas prematuras e consequentemente morte neonatal decorrente de imaturidade (Gil et al., 2014).

Para o estudo do desenvolvimento craniano e cerebral de fetos caninos, o diâmetro biparietal (DBP), a visibilização da massa cerebral, a determinação dos índices de massa e volume cerebrais e a avaliação da sua vascularização (artéria cerebral média) são parâmetros ultrassonográficos importantes para predizer idade

gestacional e avaliar o sistema nervoso central dos conceptos em cadelas (Teixeira et al., 2009; Feliciano et al., 2013).

Antes do 30º dia, contado a partir do pico de LH, é possível identificar no exame ultrassonográfico apenas uma área anecoica da cabeça, sem determinar as estruturas (Pretzer, 2008). Segundo Feliciano et al. (2013), em um dos poucos relatos de avaliação ultrassonográfica do SNC de fetos caninos, a ultrassonografia é aplicável a partir do 30º dia de gestação, quando a massa cerebral começa a ser visibilizada no crânio em seus cortes sagital e transversal.

A TN e o diâmetro transversal cerebelar (DTC) são parâmetros ultrassonográficos de avaliação dos fetos humanos no primeiro e segundo trimestres gestacionais, respectivamente (McLeary et al., 1984; Nicolaides et al., 1992), mas ainda não descritos em veterinária.

A TN é um acúmulo de líquido subcutâneo na região posterior do pescoço do feto (Bakker et al., 2014). Sua medida é obtida em corte sagital médio e consiste na espessura máxima da translucência subcutânea sobre a coluna cervical. A incidência de anormalidades fetais está relacionada com essa medida e incluem a trissomia do cromossomo 21, a síndrome de Turner e outras anormalidades cromossômicas bem como malformações e síndromes genéticas. Valores de TN iguais ou maiores que 3 mm foram definidos como marcadores de anormalidade cromossomal em humanos, cujo diagnóstico era confirmado por meio de amniocentese ou amostragem de vilosidades coriônicas guiadas por ultrassom (Nicolaides et al., 1992; Molina et al., 2006).

Existe um período adequado para realizar a mensuração da TN, uma vez que a idade gestacional influencia na sua espessura, sendo possível até a 15ª semana. Os riscos à gestação são proporcionalmente relacionados ao grau de aumento da TN. Apesar de terem sido estabelecidos diversos valores de referência ao longo dos anos, estipulou-se que devem ser consideradas elevadas as medidas maiores que 3,5 mm. A fisiopatologia do aumento da TN permanece indeterminada, mas as principais hipóteses se baseiam em insuficiência cardíaca ou em atraso no desenvolvimento do sistema linfático como causas do acúmulo de líquido na região da nuca (Bakker et al., 2014).

Valores aumentados de TN entre a 10^a e a 14^a semanas de gestação em humanos (Hyett et al., 1997) sugerem gravidez de alto risco, podendo estar relacionados a aborto espontâneo, morte intrauterina e anormalidades estruturais, principalmente cardíacas, mesmo em fetos cariotipicamente normais e torna obrigatório o acompanhamento íntimo da gravidez, incluindo a ecocardiografia fetal especializada (Michailidis e Economides, 2001).

De acordo com o *International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (ISUOG)*, o DBP deve compor a ultrassonografia fetal de rotina no segundo trimestre da gestação para estimar a idade gestacional. Ele consiste na medida da largura máxima da cabeça em corte transversal, com visibilização simétrica dos hemisférios cerebrais e da presença de uma linha hiperecoica central e contínua, que corresponde ao “*falx cerebri*” (Salomon et al., 2011).

No entanto, em humanos a avaliação do DBP apresenta limitações na predição da idade gestacional quando há oligohidrânio, gestação gemelar, anomalias uterinas, insinuação na pelve materna no final da gestação, entre outras condições que levam a dolicocefalia ou braquicefalia e conseqüentemente alteram a conformação do crânio. Nestes casos, o DTC é empregado como uma medida alternativa, pois o cerebelo localiza-se na fossa craniana posterior e, além de independer do formato da cabeça, não se afeta por pressões externas. É possível visualizá-lo na 10^a a 11^a semana gestacional em mulheres, mas seu exame ultrassonográfico se torna mais fácil no terço final (McLeary et al., 1984; Goldstein et al., 1987). Avaliações feitas entre a 13^a e a 40^a semana de gestação em mulheres, não encontraram diferenças significativas deste parâmetro entre os fetos dos gêneros masculino e feminino (Holanda-Filho et al., 2011).

Ao diagnosticar um feto aparentemente pequeno é difícil determinar se ele realmente tem um retardo de crescimento ou se a idade gestacional estimada está incorreta. Dessa maneira, foram avaliadas algumas medidas fetais em gestantes com suspeita clínica de retardo no crescimento fetal intrauterino, tais como DTC, DBP, circunferência abdominal e comprimento do fêmur. Demonstrou-se que o DTC foi capaz de estimar a idade gestacional de forma mais fidedigna do que os outros parâmetros biométricos e que é possível diagnosticar desvios de crescimento a partir da comparação entre estas medidas. A idade gestacional estimada pelos demais

parâmetros foi precoce em mais do que duas semanas e meia em relação à idade real, enquanto a idade calculada pelo DTC se mostrou compatível com a idade determinada pela data da última menstruação (Reece et al., 1987).

Além da biometria, a ecogenicidade cerebelar e o espaço do líquido retrocerebelar também são utilizados na detecção de patologias nesta estrutura. Os hemisférios cerebelares normais são hipoecoicos com bordas ecogênicas. Em humanos, as malformações cerebelares são comuns e a maioria delas pode ser diagnosticada apenas com o exame ultrassonográfico, o qual exige dois planos para uma avaliação adequada: o corte sagital médio e o transversal (Garel et al., 2011). A falha em visibilizar o cerebelo durante o exame também pode sugerir malformações, sendo alguns exemplos a displasia cerebelar, a malformação de Arnold-Chiari e o cisto de Dandy-Walker (McLeary et al., 1984). Existem alguns relatos de malformações semelhantes a essas na espécie canina (Akker, 1962; Kornegay, 1986; Rusbridge e Knowler, 2004).

2.3 Elastografia

A elastografia, de modo complementar à ultrassonografia convencional, fornece informações sobre as características elásticas dos tecidos avaliados mediante a mensuração da velocidade e direção da propagação de ondas de cisalhamento, a qual se correlaciona diretamente com a dureza do tecido.

A técnica é comparada a uma “palpação virtual” que permite melhor localizar e delimitar lesões do que a ultrassonografia. Um dos métodos elastográficos é o ARFI, o qual faz uso de forças de radiação acústica que causam deslocamentos em tecidos. A elasticidade é avaliada de forma qualitativa pela deformação que determinada força de compressão causa no tecido, elaborando uma imagem conhecida como elastograma que é comparado à imagem da ultrassonografia modo-B. Na avaliação quantitativa é feita a mensuração automática da velocidade das ondas de cisalhamento na região de interesse, escolhida na imagem da ultrassonografia convencional (Trindade, 2013).

O ARFI é um método de avaliação da rigidez tecidual que passou a ser utilizado há pouco tempo na veterinária para a diferenciação entre neoplasias mamárias benignas e malignas de cadelas (Feliciano et al., 2017) e diagnóstico de afecções

testiculares de cães (Feliciano et al., 2016). Também já foram estabelecidos valores de referência para tecidos saudáveis do pâncreas (Avante et al., 2015), das glândulas adrenais (Fernandez et al., 2017), do baço (Maronezi et al., 2015), da próstata e dos testículos (Feliciano et al., 2015) na espécie canina.

A elastografia fetal foi descrita pela primeira vez em babuínos, na avaliação da rigidez do fígado, pulmão e cérebro (Quarello et al., 2015). Estudos recentes têm demonstrado a aplicabilidade da elastografia no estudo do desenvolvimento de tecidos fetais em humanos (Zheng et al., 2016), babuínos (Quarello et al., 2016), cães (Simões, 2016) e ovinos (Silva, 2017). Dentre estes, a elastografia cerebral de fetos humanos descrita por Zheng et al. (2016) demonstrou correlação entre o desenvolvimento fetal e as modificações da rigidez de tálamo, cerebelo, plexo coroide e parênquima cerebral entre o segundo e o terceiro trimestre de gestação.

3. Referências

Akker SVD (1962) Arnold-Chiari malformation in animals. **Acta Neuropathologica** 1:39-44.

Avante ML, Feliciano MAR, Maronezi MC, Simões APR, Pavan L, Vicente WRR, Canola JC (2015) Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) Elastography in Healthy Canine Pancreas – Results Preliminary. In: 32nd World Veterinary Congress. **Anais do 32nd World Veterinary Congress**, Istambul: p. 277-277.

Bakker M, Pajkrt E, Bilardo CM (2014) Increased nuchal translucency with normal karyotype and anomaly scan: What next? **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology** 28:355-366.

Beccaglia M, Faustine M, Luvoni GC (2008) Ultrasonographic study of deep portion of diencephalo-telencephalic vesicle for the determination of gestational age of the canine foetus. **Reproduction in Domestic Animals** 43:367–370.

Beccaglia M, Luvoni GC (2004) Ultrasonographic study during pregnancy of the growth of an encephalic portion in the canine foetus. **Veterinary Research Communications** 28:161–164.

Feliciano MAR, Maronezi MC, Simões APR, Maciel GS, Pavan L, Gasser B, Silva P, Uscategui RR, Carvalho CF, Canola JC, Vicente WRR (2016) Acoustic radiation force impulse (ARFI) elastography of testicular disorders in dogs: preliminary results. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 68:283-291.

Feliciano MAR, Maronezi MC, Simões APR, Uscategui RR, Maciel GS, Carvalho CF, Canola JC, Vicente WRR (2015) Acoustic radiation force impulse elastography of prostate and testes of healthy dogs: preliminary results. **Journal of Small Animal Practice** 56:320-324.

Feliciano MAR, Nepomuceno RM, Crivalero RM, Oliveira MEF, Coutinho LN, Vicente WRR (2013) Foetal echoencephalography and Doppler ultrasonography of the middle cerebral artery in canine fetuses. **Journal of Small Animal Practice** 54:149-152.

Feliciano MAR, Uscategui RAR, Maronezi MC, Simões APR, Silva P, Gasser B, Pavan L, Carvalho CF, Canola JC, Vicente WRR (2017) Ultrasonography methods for predicting malignancy in canine mammary tumors. **Plos One** 12:1-14.

Fernandez S, Feliciano MAR, Borin-Crivellenti S, Crivellenti LZ, Maronezi MC, Simões APR, Silva PDA, Uscategui RR, Cruz NRN, Santana AE, Vicente WRR (2017) Acoustic radiation force impulse (ARFI) elastography of adrenal glands in healthy adult dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 69:340-346.

Garel C, Fallet-Bianco C, Guibaud L (2011) The fetal cerebellum: development and common malformations. **Journal of Child Neurology** 26:1483-1492.

Gil EMU, Garcia DAA, Giannico AT, Froes TR (2014) Canine fetal heart rate: Do accelerations or decelerations predict the parturition day in bitches? **Theriogenology** 82:933-941.

Goldstein I, Reece EA, Pihu G, Bovicelli L, Hobbins JC (1987) Cerebellar measurements with ultrasonography in the evaluation of fetal growth and development. **American Journal of Obstetrics & Gynecology** 156:1065-1069.

Gross B, Garcia-Tapia D, Riedesel E, Ellinwood NM, Jens JK (2010) Normal canine brain maturation at magnetic resonance imaging. **MRI** 51:361-373.

Holanda-Filho JA, Souza AI, Souza ASR, Figueroa JN, Ferreira ALCG, Cabral-Filho JE (2011) Fetal tranverse cerebellar diameter measured by ultrasound does not differ between genders. **Archives of Gynecology and Obstetrics** 284:229-302.

Hyett JA, Perdu M, Sharland GK, Nicolaides KH (1997) Increased nuchal translucency at 10-14 weeks of gestation as a marker for major cardiac defects. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology** 10:242-246.

König HE, Misek I, Mülling C, Seeger J, Liebich HG (2016) Sistema Nervoso (Systema Nervosum). In.: König HE, Liebich HG (6.ed.) **Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido**. Porto Alegre: Artmed, p. 495-568.

Kornegay JN (1986) Cerebellar Vermian Hypoplasia in Dogs. **Veterinary Pathology** 23:374-379.

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

McLeary RD, Kuhns LR, Barr Jr M (1984) Ultrasonography of fetal cerebellum. **Radiology** 151:439-442.

Michailidis GD, Economides DL (2001) Nuchal translucency measurement and pregnancy outcome in karyotypically normal fetuses. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology** 17:102-105.

Molina FS, Avgidou K, Kagan KO, Poggi S, Nicolaides KH (2006) Cystic Hygromas, Nuchal Edema, and Nuchal Translucency at 11–14 Weeks of Gestation. **Obstetrics & Gynecology** 107:678-683.

Nepomuceno AC, Garcia DAA, Barros FFPC, Coutinho LN, Feliciano MAR (2013) Ultrassonografia do sistema reprodutor feminino de pequenos animais. In.: Feliciano MAR, Oliveira MEF, Vicente WRR (Eds.) **Ultrassonografia na reprodução animal**. São Paulo: MedVet, p. 41-67.

Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K (1992) Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. **BMJ** 304:867-869.

Nicolaides KH, Heath V, Cicero S (2002) Increased fetal nuchal translucency at 11-14 weeks. **Prenatal Diagnosis** 22:308-315.

Pretzer SD (2008) Canine embryonic and fetal development: A review. **Theriogenology** 70:300-303.

Quarello E, Lacoste R, Mancini J, Melot-Dusseau S, Gorincour G (2015) Feasibility and reproducibility of ShearWave elastography of fetal baboon organs. **Prenatal Diagnosis** 35:1112–1116.

Quarello E, Lacoste R, Mancini J, Melot-Dusseau S, Gorincour G (2016) ShearWave elastography of fetal lungs in pregnant baboons. **Diagnostic and Interventional Imaging** 97:605-610.

Reece EA, Goldstein I, Pilu G, Hobbins JC (1987) Fetal cerebellar growth unaffected by intrauterine growth retardation: a new parameter for prenatal diagnosis. **American Journal of Obstetrics & Gynecology** 157:632-638.

Rusbridge C, Knowler SP (2004) Inheritance of Occipital Bone Hypoplasia (Chiari Type I Malformation) in Cavalier King Charles Spaniels. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 18:673-678.

Salomon LJ, Alfirevic Z, Berghella V, Bilardo C, Hernandez-Andrade E, Johnsen SL, Kalache K, Leung KY, Malinger G, Munoz H, Prefumo F, Toi A (2011) Practice guidelines for performance of the routine mid-trimester fetal ultrasound scan. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology** 37:116-126.

Silva PA (2017) **Ultrassonografia modo B e elastografia acoustic radiation force impulse (ARFI) de tecidos materno fetais durante a gestação em ovinos**. 33f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal.

Simões APR (2016) **Ultrassonografia modo B e elastografia ARFI pulmonar e hepática fetal como método preditivo para a maturidade dos conceptos em fase final de gestação de cadelas**. 59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal.

Teixeira MJ, Souza DMB, Melo KCM, Wischral A (2009) Estimativa da data do parto em cadelas rottweiler através da biometria fetal realizada por ultrassonografia. **Ciência Animal Brasileira** 10:853-861.

Trindade AFP (2013) **Aplicação Clínica - Avaliação da técnica Acoustic Radiation Force Impulse**. 107f. Dissertação de Mestrado. Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa.

Zheng XZ, Wul J, Tan XY (2016) A novel approach to assessing fetal tissue stiffness using virtual touch tissue quantification. **Medical Ultrasonography** 18:70-74.

CAPÍTULO 2 – Translucência nugal como técnica diagnóstica em fetos caninos

Translucência nugal como técnica diagnóstica em fetos caninos ¹

Letícia Pavan^{1,4}, Beatriz Gasser¹, Marjory Cristina Maronezi¹, Priscila Silva¹, Ricardo Andrés Ramirez Uscategui², Luciana Cristina Padilha-Nakaghi¹, Marcus Antônio Rossi Feliciano³

¹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

²Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Minas Gerais, Brasil.

³Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁴Correspondência: pavan.leticia@yahoo.com.br

Resumo

A translucência nugal (TN) é uma medida ultrassonográfica fetal obtida em corte sagital médio, que consiste em uma linha translúcida entre a pele e o tecido mole sobre a coluna cervical. A sua espessura está relacionada a diversas anormalidades cromossômicas e estruturais de grande relevância em humanos. O objetivo desse estudo foi mensurar a TN de fetos caninos a fim de estabelecer valores de referência para animais saudáveis e verificar a capacidade desse parâmetro em diagnosticar anormalidades congênitas na espécie. Foram utilizadas 26 cadelas braquicefálicas, da raça Bulldog Inglês, com idade de 1 a 4,5 anos, sendo que em cada uma foi feita

¹ Este capítulo corresponde a um artigo científico nas normas da revista “Reproduction in Domestic Animals”

a mensuração da TN de três fetos, aos 34 dias de gestação. Foi padronizado o valor de referência nos animais normais por meio de estatística descritiva e a habilidade diagnóstica do teste para a identificação de malformações fetais foi estudada por meio da análise da curva ROC. Das 26 ninhadas estudadas, 18 tiveram somente fetos saudáveis, 4 apresentaram fetos com anasarca, 3 apresentaram fetos com defeitos da parede abdominal e 1 apresentou os dois tipos de alteração. A TN foi maior ($P=0,0249$) nos fetos das cadelas que apresentaram anasarca na ninhada ($1,8 \pm 0,77$ mm) em relação às normais ($1,4 \pm 0,48$ mm), e de acordo com a análise ROC o valor de corte para a presença de anasarca foi de $TN > 1,45$ mm (sensibilidade = 61,54%, especificidade = 70,18%). A prevalência desta anormalidade foi de 18,6%. A mensuração da espessura da TN no 34º dia gestacional apresentou potencial diagnóstico para o desenvolvimento de fetos com anasarca durante a gestação de cadelas.

Palavras-chave: anasarca, edema nuchal, feto, gestação, ultrassonografia

Introdução

Faz parte do exame ultrassonográfico no pré-natal de mulheres a mensuração da translucência nuchal (TN), que consiste na espessura máxima da translucidez subcutânea entre a pele e o tecido mole sobre a coluna cervical (Nicolaidis, Azar, Byrne, Mansur, & Marks, 1992). Para obtenção de tal medida, deve-se fazer uma imagem do feto em corte sagital médio e selecionar a região mais larga da translucidez, com o cuidado de distinguir a pele fetal do âmnion, sendo o momento ideal para tal avaliação o período entre a 11ª e a 14ª semana gestacional (Kline-Fath, Bulas, & Bahado-Singh, 2015).

O aumento na espessura da TN foi inicialmente relacionado a anomalias cromossômicas, sendo a principal delas a trissomia do cromossomo 21. Sendo assim, a medida da TN se tornou o critério mais importante para a recomendação de testes de cariotipagem invasivos, como a amniocentese e a amostragem vilo-coriônica (Nicolaides, Brizot, & Snijders, 1994).

Outras anormalidades como a trissomia dos cromossomos 13 e 18, assim como a triploidia, também tiveram associação com o edema nuchal (Nicolaides, Azar, Snijders, & Gosden, 1992). Posteriormente, constatou-se que mesmo em fetos cariotipicamente normais a TN aumentada tem significado, pois funciona como uma triagem eficaz para defeitos do coração e de grandes vasos e para displasias esqueléticas, além de implicar em maiores taxas de aborto e morte perinatal (Nicolaides, Heath, & Cicero, 2002).

À medida que a espessura da TN aumenta, maior é a prevalência de diversos defeitos estruturais e síndromes genéticas, como defeitos cardíacos graves, hérnia diafragmática e onfalocele (Souka, Snijders, Novakov, Soares, & Nicolaides, 1998). Diferentes valores de referência já foram utilizados ao longo dos anos e embora ainda haja controvérsia, existe consenso que considera elevadas as medidas maiores que 3,5mm (Bakker, Pajkrt, & Bilardo, 2014).

Acredita-se que a fisiopatologia do edema da TN é multifatorial, já que está correlacionado com inúmeras anomalias. Um dos fatores seria a disfunção cardíaca, visto que há uma forte associação entre anormalidades do coração e grandes artérias com o aumento da TN, seja em fetos com cariótipo normal ou anormal. Outros fatores seriam a congestão venosa na cabeça e no pescoço (pela constrição do corpo fetal), a falha na drenagem linfática (por consequência de desenvolvimento anormal do

sistema linfático ou movimentos fetais prejudicados por distúrbios neuromusculares), a composição alterada da matriz extracelular (já que essa condição está presente em várias síndromes genéticas), além de anemia e hipoproteinemia fetal (Souka, Kaisenberg, Hyett, Sonek, & Nicolaidis, 2005).

No nosso conhecimento, até o momento não há relatos da avaliação da TN em cães. O objetivo desse estudo foi mensurar a TN de fetos caninos a fim de estabelecer valores de referência para os saudáveis e verificar a capacidade desse parâmetro diagnosticar anormalidades fetais na espécie.

Material e Métodos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP/Jaboticabal sob nº008364/18. Foi realizado um estudo prospectivo com animais oriundos de um canil comercial da cidade de Jaboticabal, cujo proprietário assinou termo de consentimento livre após ser amplamente esclarecido sobre o estudo.

Foram utilizadas 26 cadelas braquicefálicas, da raça Bulldog Inglês, com idade entre 1 e 4,5 anos. As fêmeas selecionadas foram submetidas aos exames prévios de anamnese (histórico de sanidade reprodutiva), hemograma, exames físico e obstétrico (inspeção do trato reprodutor das fêmeas).

A partir do início do proestro (determinado pela presença de edema de vulva e corrimento vaginal serossanguinolento) foi realizada citologia vaginal das cadelas a cada 48 horas, até que se constatasse a presença $\geq 90\%$ de células epiteliais cornificadas, indicando o início do estro (Kutzler, Mohammed, Lamb, & Meyers-Wallen, 2003). Durante o estro, a concentração sérica de progesterona (P4) foi mensurada, pelo método de quimioluminescência, em laboratório particular humano e

considerou-se o momento da ovulação quando $P4 > 4,0 \text{ ng/ml}$ (Gloria, Contri, Carluccio, & Robbe, 2018). As fêmeas foram submetidas à IA vaginal com sêmen fresco, a partir da ovulação, sendo estabelecido o protocolo de três inseminações, com intervalo de 48 horas.

Para a execução do exame ultrassonográfico foi realizada tricotomia ampla do abdômen, entre o apêndice xifoide e os dois últimos pares de glândulas mamárias, estendendo-se lateralmente na região ventral aos músculos lombares, próximos ao último par de costelas.

Por meio da contenção dos membros, as cadelas foram colocadas em decúbito dorsal e/ou lateral, com a cabeça na direção do monitor e o corpo paralelo ao aparelho. Antes do exame, foi aplicado gel específico para a realização de ultrassonografia. A varredura se iniciou pela região pélvica, seguindo para a região abdominal esquerda e em seguida para a região abdominal direita, objetivando-se examinar e diferenciar todos os fetos.

Os exames ultrassonográficos foram realizados com o aparelho ACUSON S2000/SIEMENS e transdutor multifrequencial matricial e linear de 9,0 MHz, aos 34 dias de gestação, quando foi verificada a presença da TN (espessura máxima da translucência subcutânea sobre a coluna cervical obtida em corte sagital médio dos fetos) e em seguida foi feita a sua mensuração. Determinou-se o dia da ovulação (1ª IA) como o primeiro dia de gestação. A data da avaliação foi estabelecida pelo momento ideal para a mensuração da TN, o qual foi adequado de acordo com observações realizadas em estudos anteriores nos quais avaliavam-se diariamente os animais (Simões et al., 2018).

Em cada fêmea foi feita a mensuração da TN de três fetos. Naquelas cujas gestações foram de um ou dois conceitos, avaliou-se todos eles. A fim de acompanhar o desenvolvimento dos conceitos e verificar a viabilidade fetal, também foi realizado exame ultrassonográfico aos 49 e 60 dias de gestação.

O momento do parto foi estimado pela idade gestacional e pelos sinais de proximidade de parto da fêmea. Todas as cadelas foram submetidas à cesariana e o procedimento foi indicado quando a frequência cardíaca de pelo menos um dos fetos considerado saudável se manteve menor ou igual a 180 bpm (Gil, Garcia, Giannico, & Froes, 2014).

Foram previamente testadas a normalidade dos resíduos (teste de Shapiro) e homocedasticidade (teste de Bartlett) do parâmetro quantitativo TN e após a comprovação, foram calculadas estatísticas descritivas em animais com ninhadas normais a fim de estabelecer parâmetros de referência. Posteriormente foi estudada a habilidade diagnóstica do teste para a identificação de ninhadas que tiveram nascimentos de malformações fetais por meio da análise das curvas ROC (receiver operator characteristic), em um modelo de regressão logística, calculando valor de corte, sensibilidade, especificidade, likelihood ratio, AUC, VPP, VPN e acurácia. O nível de significância foi definido em 5% para todos os testes.

Resultados

As 26 cadelas avaliadas tinham em média 29 ± 10 (12 – 54) meses de idade e pesaram em média $24,4 \pm 2,4$ (18,8 – 32,2) quilogramas no dia da cesariana. Dentre elas, 12 (46,15%) eram primíparas. A duração média da gestação foi de $62,3 \pm 1,4$ (59 – 66) dias e o tamanho médio da ninhada de $5,6 \pm 2,1$ (2 – 12) filhotes. O total de filhotes nascidos vivos foi de 147 ao final do estudo.

Em cada fêmea foi feita a mensuração da TN de três fetos, exceto em 3 delas, cuja gestação foi de apenas 2 conceptos. Portanto, foi avaliado um total de 75 fetos. Das 26 ninhadas estudadas, 18 tiveram somente fetos saudáveis, 4 apresentaram fetos com anasarca, 3 apresentaram fetos com defeitos da parede abdominal e 1 apresentou os dois tipos de alteração. Considerando o total de 147 fetos nascidos vivos, 8 fetos (5,44%) apresentaram sinais de anasarca ao nascimento e 7 (4,76%) apresentaram defeitos da parede abdominal.

Aos 34 dias de gestação, foi possível detectar no exame ultrassonográfico a presença de uma linha translúcida entre a pele e a coluna na região cervical, correspondente à TN (Figura 1). Todas as TN apresentaram-se anecogênicas e suas medidas variaram de 0,8 a 3,5mm. No momento da mensuração, tomou-se o cuidado de diferenciar a TN da membrana amniótica (Figura 2).

A TN foi maior ($P=0,0249$) nos fetos das cadelas que apresentaram anasarcas ($1,8 \pm 0,77$ mm) (Figura 3) em relação às ninhadas normais ($1,4 \pm 0,48$ mm), mas não se verificou diferença ($P=0,8359$) entre as ninhadas normais e as que tinham defeitos da parede abdominal ($1,5 \pm 0,4$).

De acordo com a análise ROC, determinou-se o valor de corte a TN maior que 1,45 mm, com sensibilidade=61,54%, especificidade=70,18%, likelihood ratio=2,063, AUC=66,13%, VPP=32%, VPN=88% e acurácia=69%. A prevalência desta anormalidade neste estudo foi de 18,6%.

Em duas das cinco matrizes que apresentaram anasarcas na ninhada a TN foi maior que 1,45mm no exame de 34 dias, aos 49 dias nenhuma alteração foi detectada, mas aos 60 dias observou-se que um ou mais fetos haviam desenvolvido os sinais ultrassonográficos de tal alteração.

Discussão

A TN nos fetos caninos foi capaz de identificar que uma gestação pode gerar fetos com anasarca quando ocorre edema subcutâneo na região da nuca. De acordo com os resultados obtidos, cadelas cujos fetos apresentam TN maior que 1,45mm têm duas vezes mais chances de produzir fetos com anasarca nas suas ninhadas. De modo semelhante, já está determinado que a medida da TN em humanos tem importante valor diagnóstico, visto que o aumento da sua espessura apresenta forte associação com defeitos cromossômicos e também com malformações em fetos cariotipicamente normais (Nicolaidis, Azar, Byrne, Mansur, & Marks, 1992; Souka, Kaisenberg, Hyett, Sonek, & Nicolaidis, 2005). Até o momento, não há relatos de mensuração da TN em outras espécies além da humana.

O anasarca, que em muitos casos tem causa desconhecida, consiste em edema subcutâneo excessivo que pode vir acompanhado ou não de efusão peritoneal, pleural e pericárdica. Trata-se de uma anormalidade congênita frequentemente descrita em cães da raça Bulldog Inglês, que predispõe à distocia e tem mortalidade neonatal elevada (Hopper, Richardson, & Lester, 2004; Cunto, Zambelli, Castagnetti, Linta, & Bini, 2015). Desse modo, o diagnóstico durante a gestação é importante para planejar cesarianas ou estabelecer medidas terapêuticas. Se no futuro houver uma alternativa de tratamento pré-natal para essa anormalidade, a precocidade diagnóstica que foi possível pela determinação da TN no presente estudo, pode ser fundamental para o sucesso do tratamento.

Os defeitos cardíacos são a principal causa de TN aumentada em fetos humanos euploides (Souka, Snijders, Novakov, Soares, & Nicolaidis, 1998) e a prevalência desse tipo de anormalidade aumenta com a espessura da TN, sendo de

2,89%, 9,09% e 19,51% quando a TN é de 3,5 a 4,4mm, de 4,5 a 5,4mm e maior ou igual a 5,5mm, respectivamente (Hyett, Perdi, Sharland, Snijders, & Nicolaides, 1999). Padgett, Bell, e Patterson (1986) identificaram inúmeras lesões cardíacas em fetos de Bulldog com anasarca, sendo as mais frequentes: defeito do septo ventricular, formato anormal do coração, ápice duplo e micro coração (órgão com metade do tamanho esperado). Dos 22 fetos por eles analisados, apenas 4 apresentaram coração normal e grande parte deles apresentou mais de um defeito cardíaco. No presente estudo não foram detectadas anormalidades cardíacas nos fetos com anasarca, pois a utilização da ecocardiografia fetal ainda é recente nos cães (Giannico, Gil, Garcia, Sousa, & Froes, 2015). Portanto, não é possível afirmar que, assim como em humanos, os defeitos cardíacos estão associados à etiologia que promove aumento da TN em fetos caninos.

Em 4116 gestações com aumento da TN e fetos cromossomicamente normais, a prevalência de onfalocele, assim como de defeitos cardíacos graves, foi substancialmente maior do que na população em geral (Souka, Snijders, Novakov, Soares, & Nicolaides, 1998). No entanto, no presente estudo a TN não apresentou relação entre o grupo de fetos caninos saudáveis e o de fetos com defeitos na parede abdominal. Como a medida da TN foi feita em três fetos de cada matriz escolhidos aleatoriamente, pode ser que os que apresentaram onfalocele não foram selecionados para tal avaliação.

Em fetos humanos examinados entre a 10^a e a 14^a semana gestacional, determinou-se o valor preditivo positivo (VPP) de 6,3% e o valor preditivo negativo (VPN) de 99,9% para os principais defeitos cardíacos congênitos, quando a TN é maior que 3,5mm (Hyett, Perdi, Sharland, Snijders, & Nicolaides, 1999). No presente

estudo, essa medida também se mostrou um bom indicador para descartar anasarcas, visto que a probabilidade de uma gestação canina não resultar em fetos com tal alteração (VPN) foi de 88%, quando a TN é menor ou igual a 1,45mm na avaliação aos 34 dias de gestação.

Correlacionando o desenvolvimento embrionário das espécies foi possível estabelecer o momento ideal para a mensuração da TN nas cadelas. Ao final do primeiro trimestre gestacional nas mulheres, na 13^a semana pós-menstrual, a organogênese já está completa (Woodward, 2016). Já na espécie canina, esse evento se finaliza mais tarde, no segundo trimestre, aos 35 dias de gestação (Pretzer, 2008). Assim, o melhor momento determinado neste estudo para fazer a mensuração, ao 34^o dia gestacional, é o momento final da organogênese, assemelhando-se com o melhor período em humanos para realização do exame.

A TN nos cães apresentou especificidade de 70,18% e sensibilidade de 61,54% para a identificação de anasarca fetal. Por se tratar de uma espécie múltipara, foi possível garantir que nas ninhadas de fetos saudáveis foram avaliados somente fetos sem anormalidades, no entanto, nas ninhadas com malformações, é possível que fetos saudáveis tenham sido selecionados aleatoriamente para a coleta de dados, o que reconhecemos como uma limitação da técnica ultrassonográfica.

Conclusão

Uma TN maior que 1,45mm se apresenta como ferramenta diagnóstica para o desenvolvimento de anasarca na gestação de cadelas, com sensibilidade de 61,54% e especificidade de 70,18%.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de pesquisa e bolsa produtividade (processos 131535/2018-8 e 309199/2017-4) e à Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo (auxílio temático FAPESP 2017/14957-6 e EMU FAPESP 2019/09197-8). Os autores também agradecem a Jair Matos e Siemens Healthineers pela assistência técnica.

Conflito de Interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

- Bakker, M., Pajkrt, E., & Bilardo, C.M. (2014). Increased nuchal translucency with normal karyotype and anomaly scan: What next? *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 28, 355–366. *doi: 10.1016/j.bpobgyn.2013.10.004*
- Cunto, M., Zambelli, D., Castagnetti, C., Linta, N., & Bini, C. (2015). Diagnosis and treatment of foetal anasarca in two English Bulldog puppies. *Pak Vet J*, 35(2), 251–253.
- Giannico, A.T., Gil, E.M.U., Garcia, D.A.A., Sousa, M.G., & Froes, T.R. (2015). Canine fetal echocardiography: correlations for the analysis of cardiac dimensions. *Vet Res Commun*, 40, 11–19. *doi: 10.1007/s11259-015-9648-z*
- Gil, E.M.U., Garcia, D.A.A., Giannico, A.T., & Froes, T.R. (2014). Canine fetal heart rate: Do accelerations or decelerations predict the parturition day in bitches? *Theriogenology*, 82, 933–941. *doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.04.025*
- Gloria, A., Contri, A., Carluccio, A., & Robbe, D. (2018). Blood periovulatory progesterone quantification using different techniques in the dog. *Animal Reproduction Science*, 192, 179–184. *doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.03.006*

- Hopper, B.J., Richardson, J.L., & Lester, N.V. (2004). Spontaneous antenatal resolution of canine hydrops fetalis diagnosed by ultrasound. *Journal of Small Animal Practice*, 45, 2–8.
- Hyett, J., Perdi, M., Sharland, G., Snijders, R., & Nicolaides, K.H. (1999). Using fetal nuchal translucency to screen for major congenital cardiac defects at 10-14 weeks of gestation: population based cohort study. *BMJ*, 318, 81–85.
- Kline-Fath, B.M., Bulas, D.I., & Bahado-Singh, R. (2015). *Fundamental and advanced fetal imaging: ultrasound and MRI*. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health.
- Kutzler, M.A., Mohammed, H.O., Lamb, S.V., & Meyers-Wallen, V.N. (2003). Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. *Theriogenology*, 60, 1187–1196. doi:10.1016/S0093-691X(03)00109-2.
- Nicolaides, K.H., Azar, G., Byrne, D., Mansur, C., & Marks, K. (1992). Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ*, 304, 867–869.
- Nicolaides, K.H., Azar, G., Snijders, R.J.M., & Gosden, C.M. (1992). Fetal nuchal oedema: associated malformations and chromosomal defects. *Fetal Diagn Ther*, 7, 123–131.
- Nicolaides, K.H., Brizot, M.L., & Snijders, R.J.M. (1994). Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for fetal trisomy in the first trimester of pregnancy. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 101, 782–786.
- Nicolaides, K.H., Heath, V., & Cicero, S. (2002). Increased fetal nuchal translucency at 11-14 weeks. *Prenat Diagn*, 22, 308–315. doi: 10.1002 / pd.308

Padgett, G. A., Bell, T.G., & Patterson, W.R. (1986). Genetic disorders affecting reproduction and periparturient care. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 16, 577–586.

Pretzer, S.D. Canine embryonic and fetal development: A review. (2008). *Theriogenology*, 70, 300–303. *doi:* 10.1016/j.theriogenology.2008.04.029

Simões, A.P.R., Feliciano, M.A.R., Maronezi, M.C., Uscategui, R.A.R., Bartlewski, P.M., Almeida, V.T., ... Vicente, W.R.R. (2018). Elastographic and echotextural characteristics of foetal lungs and liver during the final 5 days of intrauterine development in dogs. *Animal Reproduction Science*, 197, 170–176. *doi:* 10.1016/j.anireprosci.2018.08.025

Souka, A.P., Kaisenberg, C.S., Hyett, J.A., Sonek, J.D., & Nicolaides, K.H. (2005). Increased nuchal translucency with normal karyotype. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 192, 1005–1021. *doi:* 10.1016/j.ajog.2004.12.093

Souka, A.P., Snijders, R.J.M., Novakov, A., Soares, W. & Nicolaides, K.H. Defects and syndromes in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. (1998). *Ultrasound Obstet Gynecol*, 11, p.391–400.

Woodward, P.J. (2016). *Diagnostic Imaging: obstetrics* (3rd ed.). Philadelphia, PA: Elsevier.

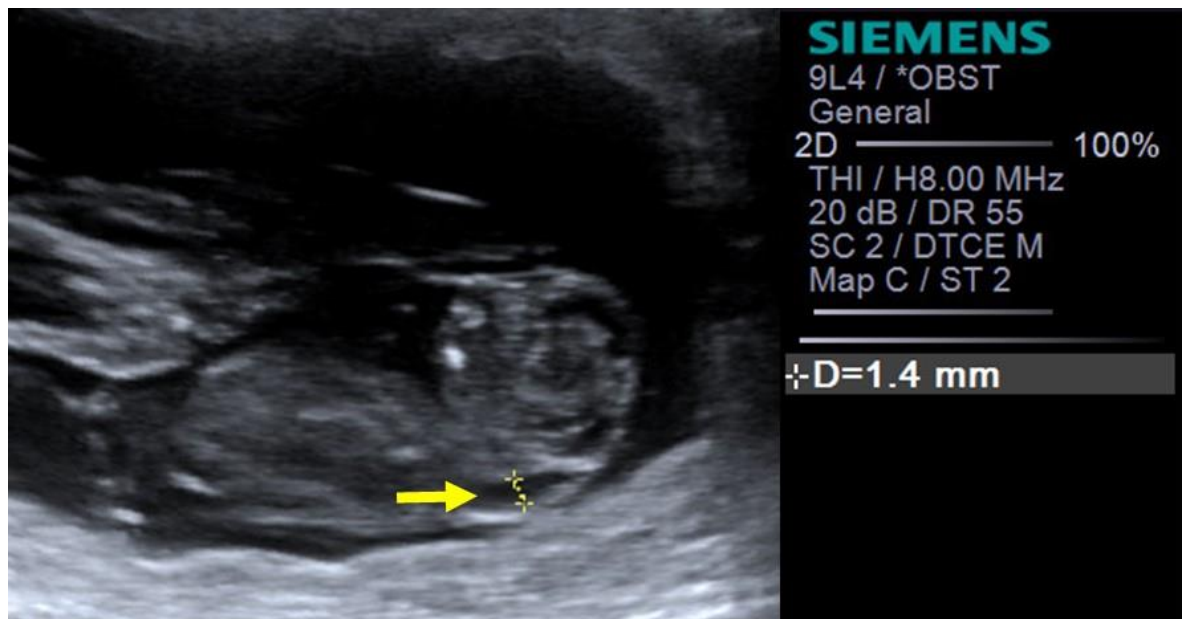
Figuras:

Figura 1. Imagem ultrassonográfica de mensuração da TN (seta) em feto canino saudável (TN=1,4mm), aos 34 dias de gestação.

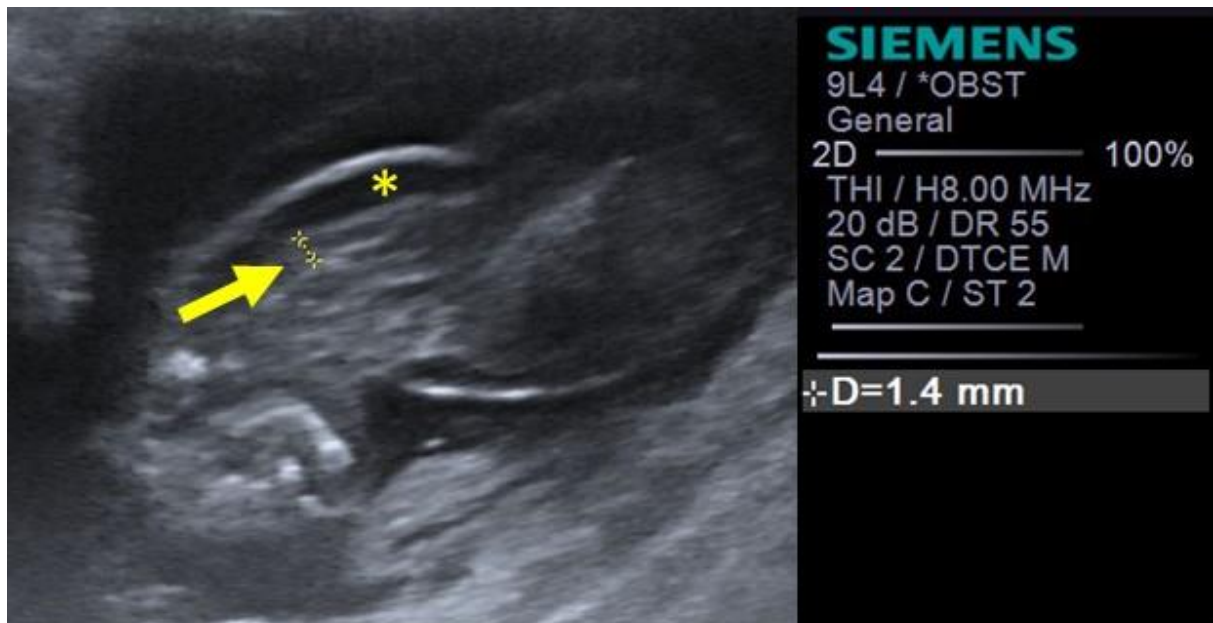


Figura 2. Imagem ultrassonográfica diferenciando a TN (seta) do amnion (*) em feto canino saudável (TN=1,4mm), aos 34 dias de gestação.

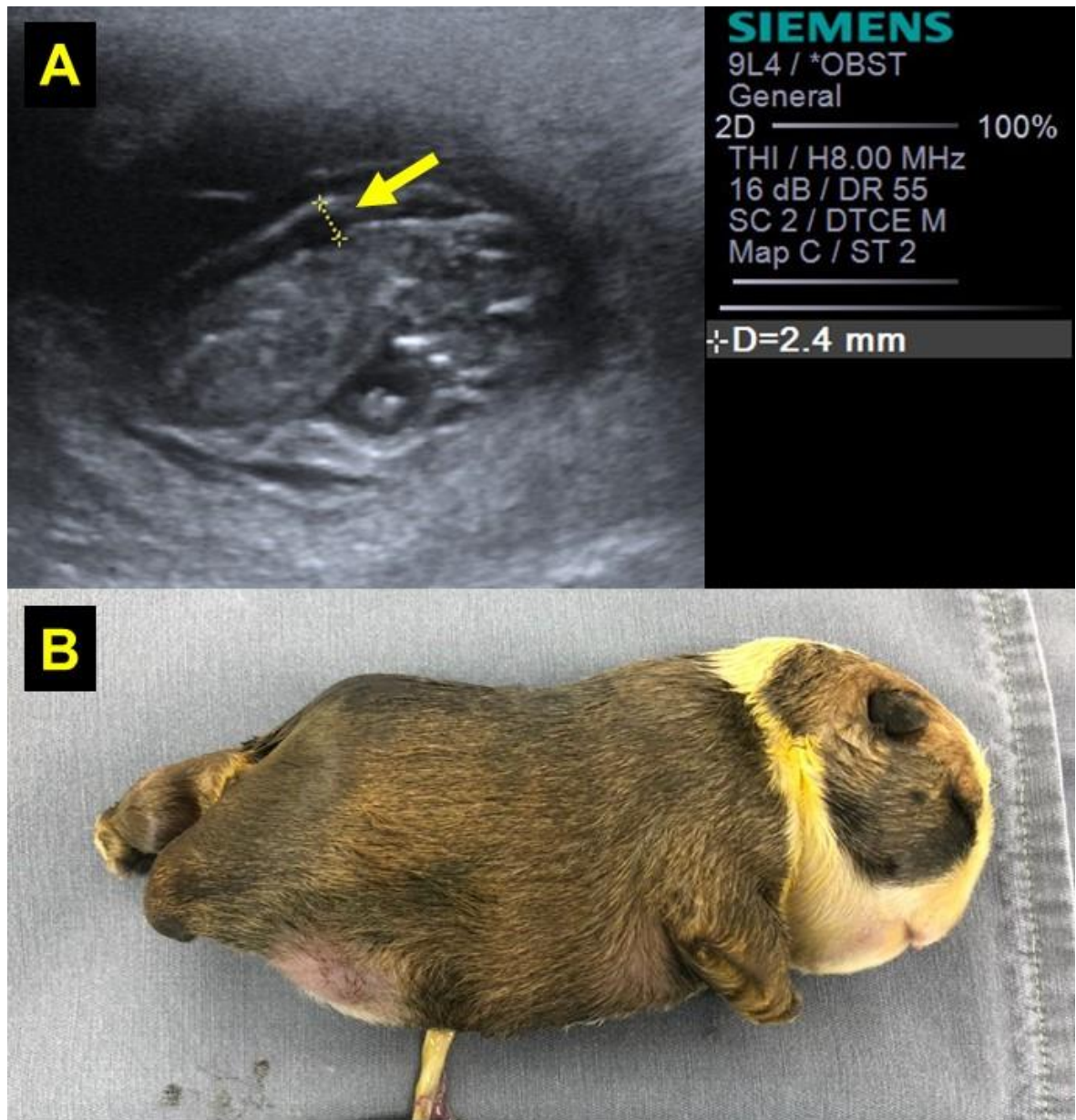


Figura 3. A: Imagem ultrassonográfica de mensuração da TN (seta) aumentada (TN=2,4mm) em feto canino, aos 34 dias de gestação. B: Feto a imagem A, apresentando anasarca ao nascimento.

CAPÍTULO 3 – Ultrassonografia modo-B e elastografia do cérebro e cerebelo de fetos caninos da raça Bulldog Inglês

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar as características ultrassonográficas (modo-B e elastografia) do sistema nervoso central de fetos caninos, como métodos complementares para prever a idade gestacional, acompanhar o desenvolvimento dos conceitos, estabelecer padrões de normalidade e auxiliar no diagnóstico de anormalidades gestacionais. Os exames ultrassonográficos foram realizados em 26 cadelas braquicefálicas, aos 34, 49 e 60 dias de gestação. O cerebelo foi avaliado em corte transversal, verificando-se seu formato, ecotextura, ecogenicidade e comprimento do seu eixo maior. A elastografia foi realizada mediante software para caracterização qualitativa e quantitativa, obtendo-se velocidades médias de cisalhamento (SWV m/s) e elastogramas do tecido fetal cerebral e cerebelar. O delineamento experimental foi em blocos (cadelas) com parcelas subdivididas no tempo (dias gestacionais) e a análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas no tempo. O cerebelo apresentou formato de “banana”, com bordas mais ecogênicas, ecotextura homogênea e hipoeico em relação aos tecidos adjacentes. O diâmetro transversal ($P=0,0001$) e a rigidez tecidual ($P=0,0006$) do cerebelo foram maiores aos 60 dias de gestação do que aos 49 dias. A SWV do cérebro correlacionou-se positivamente com dias para o parto ($P=0,0001$) e apresentou um aumento gradativo ($P=0,0001$) nos três momentos gestacionais avaliados. De acordo com a escala de cores da elastografia qualitativa, tanto o cérebro quanto o cerebelo tornaram-se mais rígidos com o avanço dos dias gestacionais. Os diâmetros biparietal (DBP) e abdominal (DA) resultaram em correlação significativa ($P<0,05$) com a idade gestacional e se adaptaram a modelos de regressão linear que permitiram estimar dias gestacionais (DG) e dias para o parto. Com as características ultrassonográficas do cerebelo e da massa cerebral, a mensuração do diâmetro transversal cerebelar e a elastografia do sistema nervoso central foi possível acompanhar o desenvolvimento dos conceitos e estabelecer padrões de normalidade. O DBP e o DA proporcionaram a criação de fórmulas para a estimativa de DG e DPP específicas para o Bulldog Inglês.

Palavras-chave: ARFI, biometria, diâmetro transversal cerebelar, gestação

Introdução

Ao longo dos anos, a ultrassonografia permitiu que fossem elaborados métodos para estimar a idade gestacional em cadelas utilizando a ecobiometria. A partir da medida de estruturas fetais e extra fetais, foram criadas fórmulas preditivas que auxiliam na prática da reprodução e obstetrícia de pequenos animais (England et al., 1990; Davidson e Baker, 2009; Michel et al., 2011; Lopate, 2018).

As particularidades da fisiologia reprodutiva dos cães dificultam a determinação precisa da idade gestacional quando se considera somente a data da cópula ou da inseminação artificial (IA): o tempo de duração do ciclo estral e da receptividade das fêmeas é variável e a viabilidade do esperma no trato reprodutivo feminino é longa. Existem situações em que é crucial saber com precisão quanto tempo tem a gestação, e entre elas está o planejamento da cesariana eletiva nas raças de elevado risco, como as braquicefálicas (Concannon et al., 1983; Lopate, 2018).

Acredita-se que há desproporção entre a pelve estreita materna e o tamanho da cabeça dos filhotes nessas raças. Para os Bulldogs, relatou-se taxa de cesariana maior que 80%, incluindo as cesarianas de emergência e as eletivas (Evans e Adams, 2010). Diante da grande variedade morfológica existente entre os cães, Groppetti et al. (2015) ressaltaram a importância do desenvolvimento de fórmulas de estimativa da idade gestacional que sejam específicas para cada raça.

O diâmetro biparietal (DBP) é uma medida usada rotineiramente no pré-natal de mulheres e também de cadelas (Luvoni e Beccaglia, 2006; Salomon et al., 2011). No entanto, algumas condições em humanos como apresentação fetal pélvica, oligohidrânio, gestações múltiplas e anomalias uterinas podem modificar a conformação craniana do feto e consequentemente o DBP. Diante disso, o diâmetro transversal cerebelar (DTC) foi apresentado como uma alternativa mais precisa para a estimativa da idade gestacional nessas situações (McLeary et al., 1984).

Ademais, a comparação do DTC com outros parâmetros biométricos pode identificar fetos humanos com crescimento reduzido. Enquanto alguns parâmetros subestimam a idade gestacional, o DTC determina uma idade compatível com a data da última menstruação (Reece et al., 1987). Quando há restrição do crescimento fetal o DTC é ligeiramente reduzido, pois acredita-se que o crescimento cerebelar humano

é relativamente resistente à hipoxemia crônica devido ao fenômeno poupador do cérebro (Vinkesteijn et al., 2000). O exame ultrassonográfico do cerebelo também permitiu sugerir a presença de malformações quando são encontradas anomalias cerebelares ou quando há falha na sua visibilização (McLeary et al., 1984). Até o momento, não há relatos de avaliação ultrassonográfica do cerebelo de fetos caninos.

A elastografia ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse) é uma técnica ultrassonográfica capaz de determinar a rigidez tecidual por meio da deformação que as forças de radiação acústica causam na região de interesse (Gennisson et al., 2013). Esse tipo de elastografia estuda a elasticidade dos tecidos de forma quantitativa e não invasiva. O seu uso no parênquima cerebral de humanos ainda é recente, mas constatou-se que os tumores cerebrais são mais rígidos que o tecido cerebral de adultos saudáveis (Hwang et al., 2018).

Recentemente essa técnica passou a ser empregada em animais, no parênquima pulmonar de fetos de babuínos (Quarello et al., 2016), nas estruturas maternas e fetais em ovelhas (Silva et al., 2018) e, em fetos caninos, no parênquima pulmonar e hepático (Simões et al., 2018). No entanto, ainda não foi aplicada no sistema nervoso central de fetos da última espécie.

O objetivo do presente estudo foi avaliar as características ultrassonográficas (modo-B e elastografia) do cérebro e do cerebelo de fetos caninos, como métodos complementares para predizer a idade gestacional, acompanhar o desenvolvimento dos conceptos, estabelecer padrões de normalidade e auxiliar no diagnóstico de anormalidades gestacionais. Além disso, delinear um modelo de regressão específico para a raça Bulldog Inglês, utilizando ecobiometrias que já são aplicadas na prática veterinária.

Material e Métodos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP/Jaboticabal sob nº008364/18. Foi realizado um estudo prospectivo com animais oriundos de um canil comercial da região de Jaboticabal. O tutor dos pacientes foi amplamente esclarecido sobre o estudo e assinou termo de consentimento livre para a participação de seus animais.

Foram utilizadas 26 cadelas braquicefálicas, da raça Bulldog Inglês, com idade de 1 a 4,5 anos. As fêmeas selecionadas foram submetidas aos exames prévios de anamnese (histórico de sanidade reprodutiva), hemograma, exames físico e obstétrico (avaliação do estado geral dos animais e inspeção do trato reprodutor das fêmeas).

A partir do início do proestro (determinado pela presença de edema de vulva e corrimento vaginal serossanguinolento) foi realizada citologia vaginal das cadelas a cada 48 horas, até que se constatasse a presença $\geq 90\%$ de células epiteliais cornificadas, indicando o início do estro (Kutzler et al., 2003). Durante o estro, a concentração sérica de progesterona (P4) foi mensurada, pelo método de quimioluminescência, em laboratório particular humano e considerou-se o momento da ovulação quando $P4 > 4,0 \text{ ng/ml}$ (Gloria et al., 2018). As fêmeas foram submetidas à IA vaginal com sêmen fresco, a partir da ovulação, sendo estabelecido o protocolo de três inseminações, com intervalo de 48 horas.

Para a execução dos exames ultrassonográficos das fêmeas foi realizada tricotomia ampla do abdômen, entre o apêndice xifoide e os dois últimos pares de glândulas mamárias, estendendo-se lateralmente na região ventral aos músculos lombares, próximos ao último par de costelas.

Por meio da contenção dos membros, as cadelas foram colocadas em decúbito dorsal e/ou lateral, com a cabeça na direção do monitor e o corpo paralelo ao aparelho. Antes do exame, foi aplicado gel específico para a realização de ultrassonografia. A varredura se iniciou pela região pélvica, seguindo para a região abdominal esquerda e em seguida para a região abdominal direita, objetivando-se examinar e diferenciar todos os fetos, no intuito de avaliar os mesmos três fetos em todos os exames de cada matriz.

Os exames ultrassonográficos foram realizados com o aparelho ACUSON S2000/SIEMENS e transdutor multifrequencial matricial e linear de 9,0 MHz. Como a detecção do cérebro dos fetos é possível a partir da 5ª semana gestacional (Feliciano et al., 2013), o sistema nervoso dos conceptos foi avaliado quinzenalmente a partir desse momento. O primeiro exame foi realizado aos 34 dias de gestação e o segundo após 15 dias, com 49 dias de gestação. Determinou-se o dia da ovulação (1ª IA) como o primeiro dia de gestação. Devido à calcificação do crânio fetal que acontece na última semana gestacional (Feliciano et al., 2013), foi necessário realizar a terceira

avaliação com intervalo de 11 dias da penúltima coleta, aos 60 dias de gestação (Tabela 1). Em cada fêmea foi feita a avaliação do sistema nervoso central de três fetos. Naquelas cujas gestações foi de um ou dois conceitos, avaliou-se todos eles.

Tabela 1. Momento gestacional em que cada estrutura fetal foi avaliada por meio da ultrassonografia.

		Momento gestacional da avaliação		
		34 dias	49 dias	60 dias
Estrutura fetal	DBP	X	X	X
	DA	X	X	X
	Massa cerebral	X	X	X
	Cerebelo		X	X

DBP: diâmetro biparietal; DA: diâmetro abdominal.

O momento do parto foi estimado pela idade gestacional e pelos sinais de proximidade de parto da fêmea. Todas as cadelas foram submetidas à cesariana e o procedimento foi indicado quando a frequência cardíaca de pelo menos um dos fetos considerado saudável se manteve menor ou igual a 180 bpm (Gil et al., 2014).

Ultrassonografia modo-B

Por meio da ultrassonografia dos conceitos foram verificadas: presença da massa cerebral, seu formato em corte transversal, ecotextura (homogênea ou heterogênea) e ecogenicidade; o cerebelo foi avaliado em corte transversal, após identificação da massa cerebral e angulação caudal do transdutor até obtenção da sua imagem, verificando-se seu formato, ecotextura (homogênea ou heterogênea), ecogenicidade e comprimento do seu eixo maior (DTC). De modo complementar, foram realizadas as medidas do diâmetro abdominal (DA) e do DBP dos fetos.

Elastografia

A elastografia do sistema nervoso dos fetos caninos foi realizada após o exame ultrassonográfico modo-B, mediante software para caracterização qualitativa e quantitativa utilizando o método ARFI/VTQ (Acoustic Radiation Force Impulse / Virtual Touch Tissue Quantification, Siemens, Germany).

Para a padronização da técnica elastográfica quantitativa do tecido fetal cerebral e cerebelar, foram definidas no mínimo três regiões de interesse em cada

órgão tentando abranger todo o seu parênquima, e mediante a função automática do software foram obtidas as velocidades das ondas de cisalhamento (SWV) de cada um dos tecidos e os valores médios destas avaliações são em m/s.

Utilizando a técnica ARFI qualitativa, foram formadas imagens coloridas das estruturas estudadas, para avaliação da rigidez tecidual relativa (elastograma). Esta informação é calculada por meio da análise dos deslocamentos relativos de elementos teciduais devido a um pulso de pressão acústica. Este software elabora um mapa em escala colorida no qual os tons azulados representam tecidos menos rígidos e os tons avermelhados tecidos mais rígidos, ou seja, não deformáveis.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software R-project (R® foundation for statistical computing, Austria). O delineamento experimental foi em blocos casualizado (cadelas) com parcelas subdivididas no tempo (dias gestacionais). Foram previamente testadas a normalidade dos resíduos (teste de Shapiro) e homocedasticidade (teste de Bartlett) de cada um dos parâmetros quantitativos. As medidas reais ou transformadas destes parâmetros ultrassonográficos foram comparadas entre os dias de gestação pela análise de variância (ANOVA) ou teste de Friedman. Sendo constatada significância, foram comparadas as médias ou medianas pelos testes de Tukey ou Dunns e testados os ajustes dos parâmetros aos contrastes matemáticos de regressão (linear, quadrático e cúbico). Os parâmetros ultrassonográficos também foram correlacionados entre si pelos testes de Spearman ou Pearson. O nível de significância foi definido em 5% para todos os testes.

Resultados

As 26 cadelas avaliadas tinham em média 29 ± 10 (12 – 54) meses de idade e pesaram em média $24,4 \pm 2,4$ (18,8 – 32,2) quilogramas no dia da cesariana. Dentre elas, 12 (46,15%) eram primíparas. A duração média da gestação foi de $62,3 \pm 1,4$ (59 – 66) dias e o tamanho médio da ninhada de $5,6 \pm 2,1$ (2 – 12) filhotes. O total de filhotes nascidos vivos foi de 147 ao final do estudo.

Em cada fêmea foi feita a avaliação do sistema nervoso central de três fetos, exceto em 3 delas, cuja gestação foi de apenas 2 conceitos. Portanto, foi avaliado um total de 75 fetos. Das 26 ninhadas estudadas, 18 tiveram somente fetos saudáveis, 4 apresentaram fetos com anasarca, 3 apresentaram fetos com defeitos da parede abdominal e 1 apresentou os dois tipos de alteração, ou seja, 30,7% (8/26) das ninhadas tiveram pelo menos um feto com malformação. Considerando o total de 147 fetos nascidos vivos, 10,2% (15/147) apresentaram malformação, sendo 53,3% (8/15) anasarca e 46,6% (7/15) defeitos da parede abdominal.

Nas cadelas cuja ninhada era menor ou igual a 4 fetos (n=10) foi possível diferenciá-los de acordo com a posição no abdômen da matriz e avaliar os mesmos fetos nas três avaliações. Nas demais cadelas (n=16), os fetos foram escolhidos aleatoriamente para avaliação, pois não era possível fazer tal diferenciação ao longo da gestação.

Ultrassonografia Modo-B

Tanto o DBP quanto o DA resultaram em correlação significativa ($P < 0,05$) com a idade gestacional e se adaptaram a modelos de regressão linear que permitiram estimar os dias gestacionais (DG) e os dias para o parto (DPP) (Figura 1, Tabela 2).

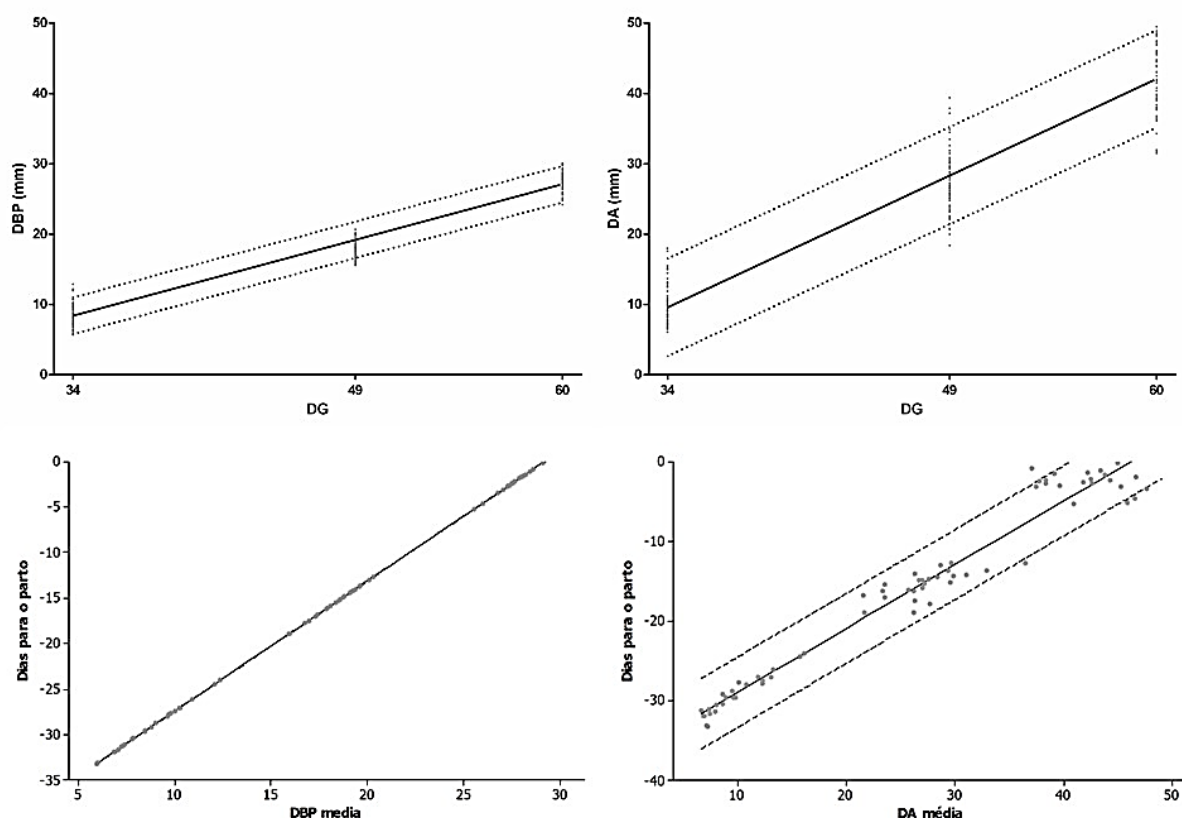


Figura 1. Representação gráfica dos parâmetros ecobiométricos diâmetro biparietal (DBP) (esquerda) e diâmetro abdominal (DA) (direita) durante a gestação em cadelas da raça Bulldog inglês, correlacionados com os dias gestacionais (DG) e os dias para o parto. A linha contínua corresponde ao modelo de regressão adaptado e as pontilhadas à previsão com 95% de confiança.

Tabela 2. Resultado dos contrastes matemáticos de regressão dos parâmetros diâmetro biparietal (DBP) e diâmetro abdominal (DA), com os dias gestacionais (DG) e com os dias para o parto (DPP), em cadelas da raça Bulldog Inglês.

Parâmetro	Fórmula de predição	R2
DBP	DG = 23,26 + 1,338*DBP	0,9949
	DPP = - 41,69 + 1,429*DBP	0,999
DA	DG= 28,23 + 0,7276*DA	0,9979
	DPP = - 36,94 + 0,8009*DA	0,962

A massa cerebral foi avaliada em corte transversal da cabeça dos fetos, detectando-se os dois hemisférios, de formato circular a ovalado, ecotextura homogênea e hiperecoica em relação aos tecidos adjacentes, com aspecto de “borboleta” (Figura 2).

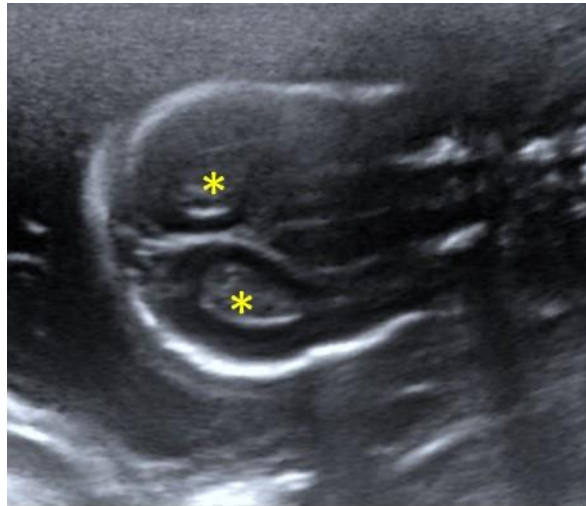


Figura 2. Imagem ultrassonográfica da massa cerebral (asteriscos) de feto canino saudável, aos 49 dias de gestação.

O cerebelo foi avaliado em corte transversal da cabeça, inclinando caudalmente o transdutor. Ele apresentou formato de “banana”, com bordas mais ecogênicas, ecotextura homogênea e hipoeicoica em relação aos tecidos adjacentes (Figura 3).

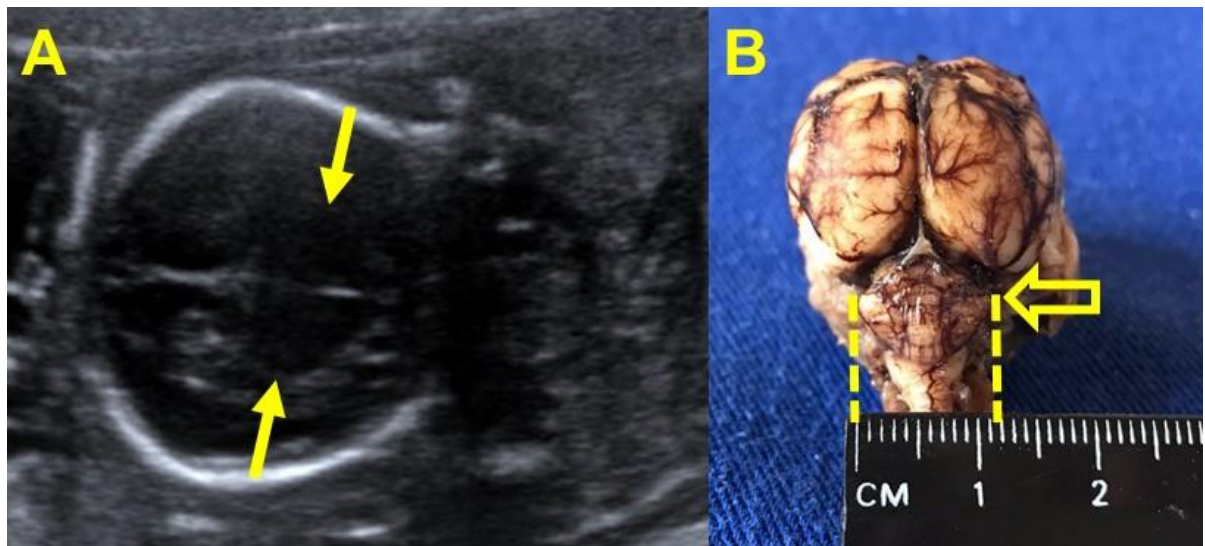


Figura 3. A: Imagem ultrassonográfica do cerebelo (entre setas) de feto canino saudável, aos 49 dias de gestação. B: Peça anatômica do cerebelo (seta aberta) de um natimorto, com representação da medida do DTC (linha tracejada).

O DTC no dia 60 foi maior que no dia 49 ($P=0,0001$), sendo sua média $12,28 \pm 1,03\text{mm}$ e $8,28 \pm 0,88\text{mm}$, respectivamente (Figura 4). O DTC apresentou correlação com o DBP ($P=0,0001$ e $r=0,9210$; Figura 5).

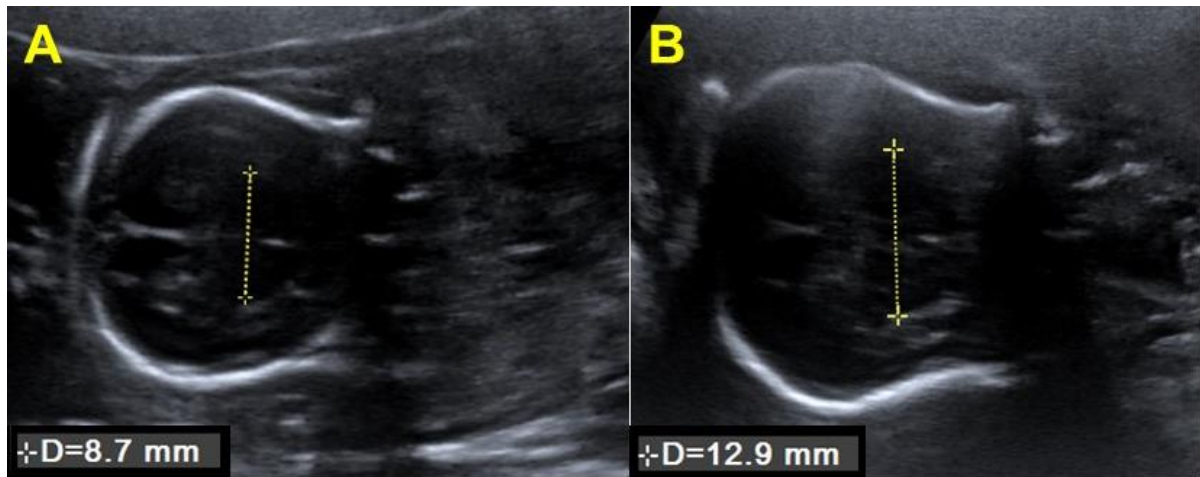


Figura 4. Imagem ultrassonográfica de mensuração do diâmetro transversal cerebelar (DTC) de feto canino saudável, aos 49 (A) e 60 (B) dias de gestação.

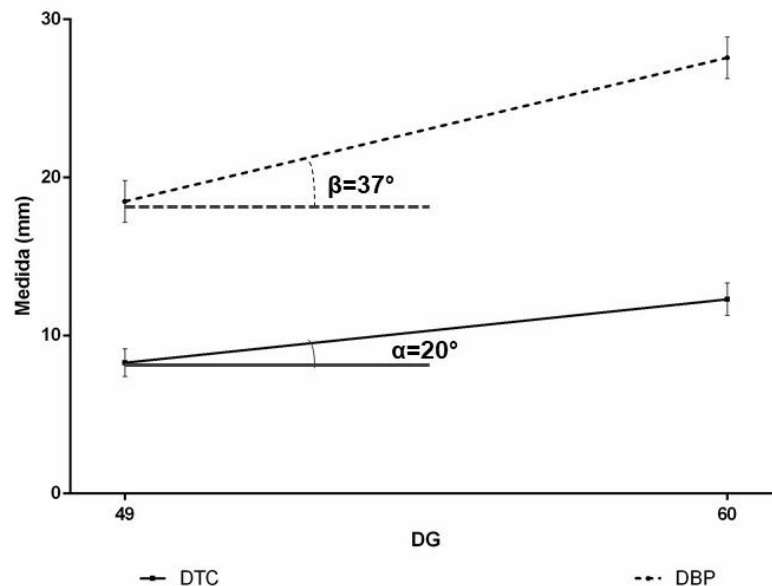


Figura 5. Representação gráfica dos parâmetros ecobiométricos diâmetro transversal cerebelar (DTC, linha contínua) e diâmetro biparietal (DBP, linha pontilhada) em cadelas da raça Bulldog inglês, correlacionados com os dias gestacionais (DG), e os seus respectivos coeficientes angulares (α e β).

Elastografia

Não houve diferença entre os três valores de SWVCérebro obtidos de um mesmo feto ($P=0,983$; diferença média=0,0172) e nem entre os dois ou três fetos avaliados de uma mesma cadela ($P=0,979$; diferença média=0,0185), em cada momento gestacional. O mesmo ocorreu com a SWVCerebelo de um mesmo feto ($P=0,921$; diferença média=0,0384) e entre os fetos de uma mesma cadela ($P=0,693$; diferença média=0,0721).

A rigidez tecidual do cerebelo foi maior aos 60 dias quando comparada com a rigidez aos 49 dias ($P=0,0006$). A SWV do cerebelo foi de $1,88 \pm 0,36$ m/s no terceiro exame ultrassonográfico e $1,65 \pm 0,25$ m/s no segundo. Não houve diferença entre os valores de profundidade das amostras ($P=0,7563$).

A SWV da massa cerebral apresentou um aumento gradativo ($P=0,0001$) nos três momentos gestacionais avaliados, sendo de $1,58 \pm 0,38$ m/s na primeira avaliação, $1,88 \pm 0,30$ m/s na segunda e $2,32 \pm 0,39$ m/s na última. Este aumento pode ser explicado por um modelo de regressão linear ($P=0,0001$ e $R^2=0,9596$): $DG = 20,28 + 14,22 \cdot SWVCérebro$ (Figura 6). Não houve diferença entre os valores de profundidade das amostras ($P=0,2194$).

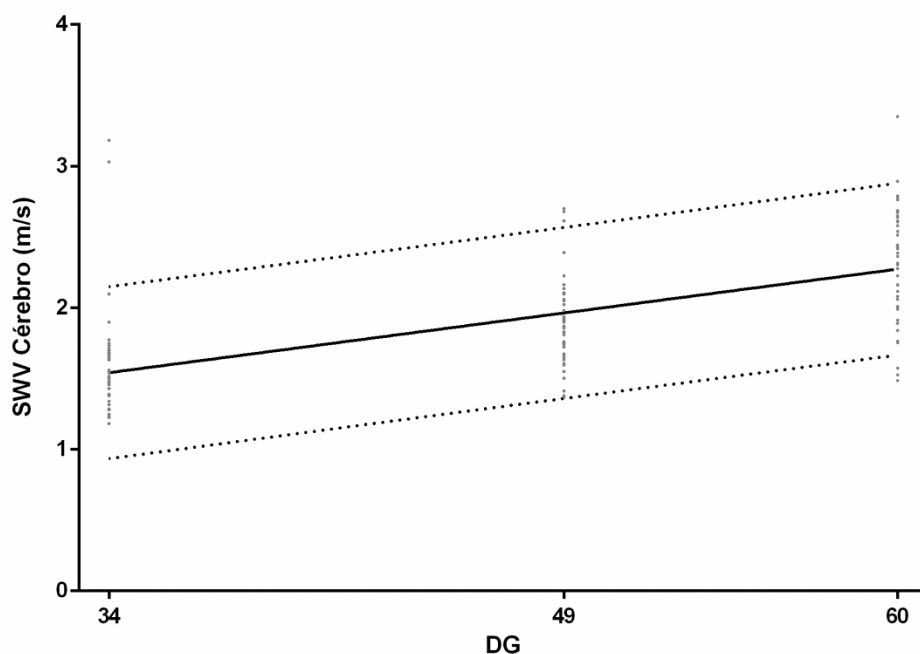


Figura 6. Representação gráfica da SWVCérebro com os dias gestacionais (DG) em cadelas da raça Bulldog inglês. A linha contínua corresponde ao modelo de regressão ($DG = 20,28 + 14,22 \cdot SWVCérebro$) adaptado a este parâmetro e as pontilhadas à previsão com 95% de confiança.

A SWVCérebro correlacionou-se positivamente com DPP ($P=0,0001$, $R^2=0,529$; $DPP = -54,55 + 20,28 * SWVCérebro$; Figura 7).

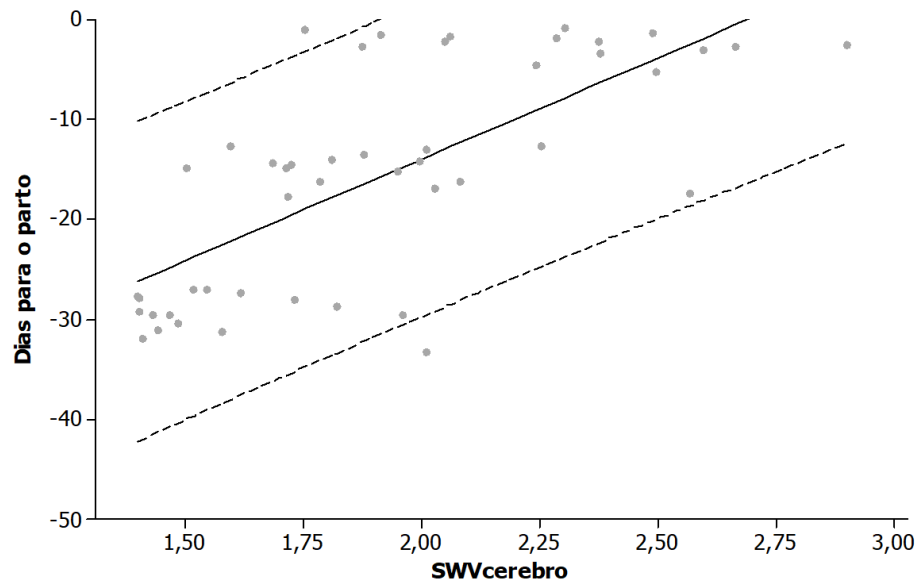


Figura 7. Representação gráfica da SWVCérebro com os dias para o parto (DPP) em cadelas da raça Bulldog inglês. A linha contínua corresponde ao modelo de regressão ($DPP = 54,55 + 20,28 * SWVCérebro$) adaptado a este parâmetro e as pontilhadas à previsão com 95% de confiança.

Na elastografia qualitativa, o cerebelo apresentou tonalidades azul escuro no segundo exame e azul claro a esverdeado no terceiro exame (Figura 8).

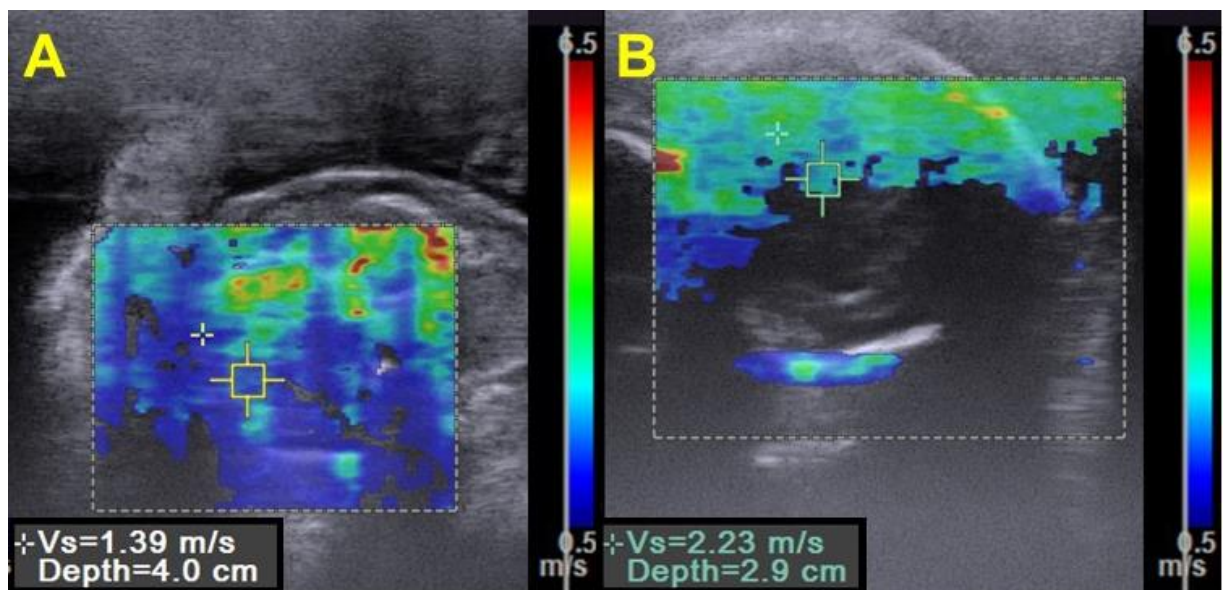


Figura 8. Imagens ultrassonográficas de elastografia qualitativa e quantitativa do cerebelo de feto canino, aos 49 (A) e aos 60 (B) dias de gestação.

Já as massas cerebrais apresentaram coloração azul escuro aos 34 dias de gestação (Figura 9), com 49 dias coraram em tonalidades de azul claro e passaram a ser esverdeadas aos 60 dias de gestação (Figura 10).

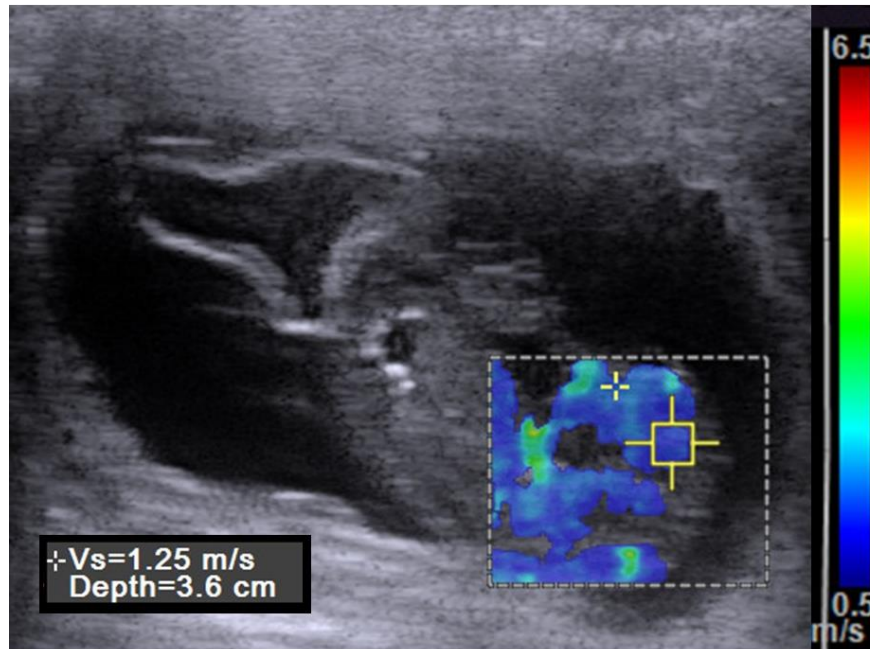


Figura 9. Imagem ultrassonográfica de elastografia qualitativa e quantitativa da massa cerebral de feto canino aos 34 dias de gestação.

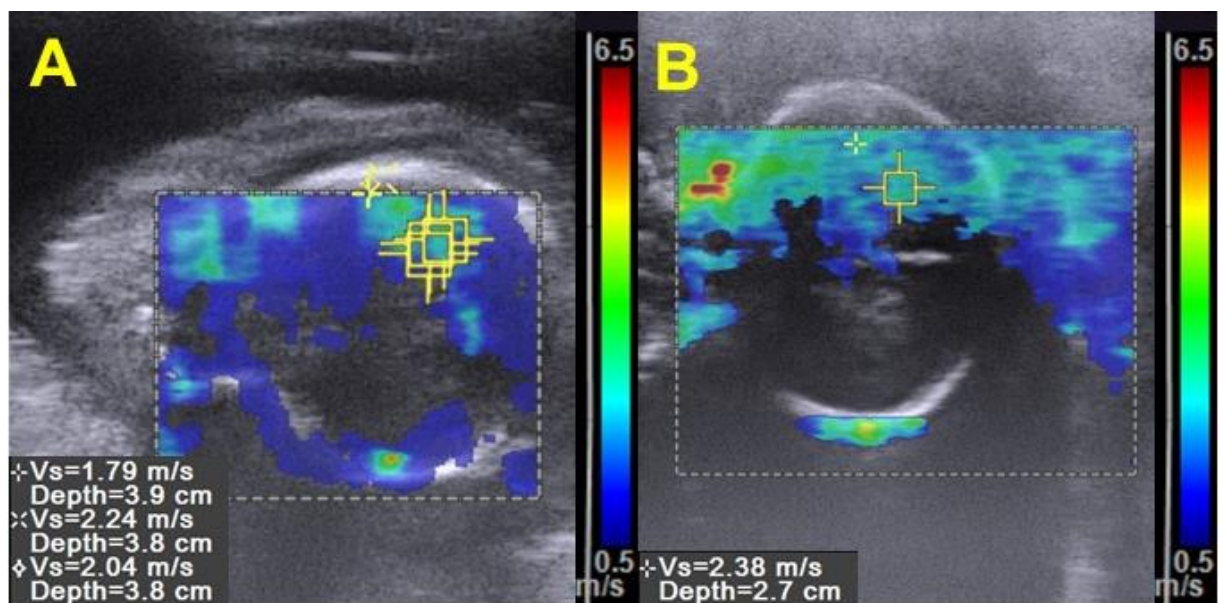


Figura 10. Imagens ultrassonográficas de elastografia qualitativa e quantitativa da massa cerebral de feto canino, aos 49 (A) e 60 (B) dias de gestação.

Não foi possível identificar casos de anormalidades congênitas (anasarca e defeitos da parede abdominal) por meio de nenhuma das variáveis ultrassonográficas estudadas, tanto pelo modo-B ($P_{DBP}=0,5597$ e $P_{DA}=0,8500$) quanto pela elastografia ($P_{SWVCerebelo}=0,2034$ e $P_{SWVCérebro}=0,8479$).

Discussão

A partir da segunda metade da gestação o DA e o DBP são os principais parâmetros biométricos com fórmulas disponíveis para estimar a idade gestacional e o número de dias para o parto nos cães (Michel et al., 2011; Lopate, 2018). Para o desenvolvimento de tais fórmulas, alguns autores estabeleceram padrões de peso ou de raça dos animais (England et al., 1990; Luvoni e Grioni, 2000; Son et al., 2001; Groppetti et al., 2015). No caso do Bulldog Inglês, determinou-se a média de $30,8 \pm 0,1$ mm para o DBP entre o 59º e o 61º dia a partir da ovulação, com um único exame ultrassonográfico realizado imediatamente antes da cesariana (Batista et al., 2014). Contudo, no nosso conhecimento, ainda não há estudos que resultaram em fórmulas preditivas para a raça.

O DBP e o DA apresentaram modelo de regressão linear ($P < 0,05$) depois de serem mensurados aos 34, 49 e 60 dias de gestação. Os resultados obtidos com o DBP foram excelentes tanto na sua correlação com DG ($R^2=0,9949$) como com DPP ($R^2=0,999\%$). Já o DA foi mais acurado na estimativa de DG ($R^2=0,9979\%$) do que de DPP ($R^2=0,962\%$). Resultados semelhantes foram obtidos em cadelas das raças maltês e yorkshire terrier ($R^2=0,99$ nas duas raças) utilizando o DBP para estimar DG (Son et al., 2001). Luvoni e Grioni (2000), por sua vez, obtiveram melhor acurácia ($R^2=0,98$) ao correlacionar o DBP com DPP no grupo de pequeno porte, cujos animais eram todos da raça Jack Russel terrier, do que no grupo de médio porte ($R^2=0,92$), no qual incluíram animais mestiços. Essas informações confirmam o que foi proposto sobre a realização de estudos que selecionem os animais por tamanho (Beccaglia et al., 2008) ou por raça (Groppetti et al., 2015), visto que as variações existentes entre raças na espécie canina afetam tanto o tempo de duração da gestação (Eilts et al., 2005) como a estimativa da idade gestacional por meio da ultrassonografia, tornando-a menos precisa (Davidson e Baker, 2009).

De todos os fetos nascidos vivos, 10,2% apresentaram malformações, os quais pertenciam a 30,7% das ninhadas. Existe dado semelhante em relação às ninhadas não saudáveis (31%), mas com menor incidência (7,4%) de malformações em filhotes de Bulldog Inglês (De Cramer e Nöthling, 2019). Em outro estudo, no qual 8,2% dos filhotes nasceram com defeitos congênitos, a incidência de anasarca foi menor (27,7%) que a do nosso estudo (53,3%), no entanto o número de casos de fenda palatina foi muito maior (38,8%), visto que essa malformação não foi encontrada nas nossas ninhadas (Wydooghe et al., 2013). Considerando o total de fetos (malformados e saudáveis), a incidência de anasarca no presente estudo ($8/147=5,44\%$) equiparou-se ao que já foi relatado (5,3%) nessa raça (Batista et al., 2014).

Pela primeira vez avaliou-se o cerebelo de fetos caninos por meio da ultrassonografia. O processo de organogênese se completa no período embrionário, estendendo-se até o 35º dia gestacional (Pretzer, 2008), e apesar de realizarmos o primeiro exame ultrassonográfico muito próximo dessa data (aos 34 dias) a estrutura cerebelar ainda não era visível. Foi possível examinar o cerebelo nos dias 49 e 60. O seu diâmetro em corte transversal aumentou de tamanho do primeiro ($8,28\pm0,88\text{mm}$) para o segundo ($12,28\pm1,03\text{mm}$) exame. Da mesma forma, o DTC de fetos humanos com desenvolvimento normal cresce com o avanço das semanas gestacionais (Vinkesteijn et al., 2000). Novas pesquisas com exames seriados desse órgão precisam ser feitas para estabelecer o perfil do crescimento cerebelar nos fetos caninos durante a gestação.

No presente estudo, o DBP foi correlacionado com o DTC. Na figura 6 é possível notar que o coeficiente angular do DBP ($\alpha=37^\circ$) é maior que do DTC ($\alpha=20^\circ$), ou seja, o primeiro parâmetro aumenta mais rapidamente que o segundo, no intervalo gestacional avaliado. Tratando-se de animais braquicefálicos, isso pode ser explicado pelo tamanho do crânio dos fetos que é relativamente grande (Wydooghe et al., 2013).

Em humanos, por meio do exame do cerebelo fetal é possível diagnosticar afecções como malformação de Chiari tipo 2, malformação de Dandy-Walker, disgenesia vermiana e hipoplasia cerebelar (McLeary et al., 1984; Woodward, 2016). Em ovelhas, a ultrassonografia fetal já foi utilizada para diagnosticar malformação de Chiari tipo 2 por meio da detecção do vermis cerebelar abaixo do nível do forame magno (Guilbaud et al., 2014). Conhecendo os aspectos ultrassonográficos normais

do cerebelo fetal na espécie canina, sugere-se que a sua avaliação poderia ser adicionada ao exame gestacional de cadelas, com o propósito de detectar malformações cerebelares existentes nessa espécie, mas que são diagnosticadas somente após o nascimento e muitas vezes no exame *post mortem* (Pass et al., 1981; Kornegay, 1986; Fyfe et al., 2010).

Diferentemente do cerebelo, o cérebro fetal canino já foi explorado por meio da ultrassonografia, resultando em informações sobre a vascularização da artéria cerebral média, os índices de massa e volume cerebrais (Feliciano et al., 2013) e a porção profunda da vesícula diencéfalo-telencefálica (Beccaglia e Luvoni, 2004; Beccaglia et al., 2008). Ao modo-B, foi possível visibilizar os dois hemisférios cerebrais em formato de “borboleta”, no corte transversal do crânio fetal, da mesma forma que foi relatado anteriormente (Feliciano et al., 2013). A técnica de elastografia, por sua vez, nunca foi aplicada à massa cerebral, e nem aos outros componentes do SNC de fetos caninos.

Tanto na elastografia qualitativa quanto na quantitativa, o cérebro e o cerebelo apresentaram aumento da rigidez com o desenvolvimento da gestação. Quando se avaliou por meio da elastografia a substância branca, o tálamo, os gânglios basais, o cerebelo e o *falx cerebri* de neonatos humanos, os resultados foram semelhantes, pois indicaram que essas estruturas nos prematuros são mais macias do que nos neonatos nascidos a termo (Su et al., 2014; Albayrak e Kasap, 2018). Pelos valores da velocidade de cisalhamento foi possível correlacionar, pela primeira vez em cães, a rigidez do parênquima cerebral com o avanço da gestação, da mesma forma relatada em neonatos humanos (Su et al., 2014). A SWV Cérebro apresentou modelo de regressão linear e melhor correlação com DG ($R^2=0,9596$) do que com DPP ($R^2=0,529$).

Na aplicação da técnica de elastografia por compressão, os tecidos intracranianos de neonatos humanos (ventrículo lateral, substância branca periventricular, substância branca caudada, substância branca subcortical, substância cinzenta cortical e espaço subdural) apresentaram diferentes elasticidades (Kim et al., 2017), do mesmo modo que no presente estudo a rigidez do cerebelo e do parênquima cerebral fetais foram diferentes.

Em fetos humanos, a SWV do parênquima cerebral foi $2,22 \pm 0,97$ m/s e $3,29 \pm 1,05$ m/s, enquanto a SWV do cerebelo foi $1,14 \pm 0,36$ m/s e $1,26 \pm 0,53$ m/s, no segundo e no terceiro trimestre gestacionais, respectivamente (Zheng et al., 2016). Da mesma forma, o cerebelo apresentou-se menos rígido do que o parênquima cerebral nos fetos caninos. Ao passo que a SWV do primeiro foi $1,65 \pm 0,25$ m/s e $1,88 \pm 0,36$ m/s, a SWV do cérebro foi $1,88 \pm 0,30$ m/s e $2,32 \pm 0,39$ m/s, nos dias 49 e 60, respectivamente. À medida que se estabeleceram os valores normais para a rigidez do cérebro e do cerebelo, sugere-se que esse tipo de exame possa auxiliar futuramente no diagnóstico de doenças que acometem o SNC de fetos caninos. O mesmo foi proposto por deCampo e Hwang (2018), quando citaram que o edema, a pressão intracraniana e as alterações de perfusão estão comumente presentes após lesão cerebral e que eles podem influenciar na rigidez, assim como a presença de hidrocefalia.

A limitação prática da técnica foi a movimentação dos fetos, pois a VTTQ é muito sensível aos artefatos de movimento, conforme relatado por Zheng et al. (2016). Portanto, o principal motivo pelo qual avaliamos somente 3 fetos de cada cadela foi a necessidade de aguardar o momento em que eles estivessem parados para realizar a elastografia. Apesar de acomodarmos as matrizes em colchão macio e garantirmos conforto térmico com ar condicionado, a avaliação de todos os fetos em ninhadas numerosas faria com que o exame durasse mais de uma hora, podendo gerar estresse e/ou desconforto a elas.

Beccaglia et al. (2008) mencionaram a dificuldade de avaliar as estruturas cerebrais em cães quando o crânio dos fetos já está quase calcificado, ou seja, no período próximo ao parto. Realmente, o exame nos dias 34 e 49 foram executados com maior facilidade e originaram imagens ultrassonográficas de melhor qualidade. No entanto, foi possível realizar o exame aos 60 dias sem comprometimento na coleta dos dados.

Conclusão

Com as características ultrassonográficas do cerebelo e da massa cerebral, a mensuração do DTC e a elastografia do sistema nervoso central foi possível

acompanhar o desenvolvimento dos conceitos e estabelecer padrões de normalidade. O DBP e o DA proporcionaram a criação de fórmulas para a estimativa de DG e DPP específicas para o Bulldog Inglês e a SWV Cérebro apresentou ótima correlação com DG.

Referências

Albayrak E, Kasap T (2018) Evaluation of neonatal brain parenchyma using 2-dimensional shear wave elastography. **Journal of Ultrasound in Medicine** 37:959–967.

Batista M, Moreno C, Vilar J, Golding M, Brito C, Santana M, Alamo D (2014) Neonatal viability evaluation by Apgar score in puppies delivered by cesarean section in two brachycephalic breeds (English and French bulldog). **Animal Reproduction Science** 146:218–226.

Beccaglia M, Faustine M, Luvoni GC (2008) Ultrasonographic study of deep portion of diencephalo-telencephalic vesicle for the determination of gestational age of the canine foetus. **Reproduction in Domestic Animals** 43:367–370.

Beccaglia M, Luvoni GC (2004) Ultrasonographic study during pregnancy of the growth of an encephalic portion in the canine foetus. **Veterinary Research Communications** 28:161–164.

Concannon P, Whaley S, Lein D, Wissler R (1983) Canine gestation length: variation related to time of mating and fertile life of sperm. **American Journal of Veterinary Research** 44:1891-1821.

Davidson AP, Baker TW (2009) Reproductive ultrasound of the bitch and queen. **Topics in Companion Animal Medicine** 24:55-63.

De Cramer KGM, Nöthling JO (2019) Curtailing parturition observation and performing preparturient cesarean section in bitches. **Theriogenology** 124:57–64.

deCampo D, Hwang M (2018) Characterizing the neonatal brain with ultrasound elastography. **Pediatric Neurology**. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2018.06.005.

Eilts BE, Davidson AP, Hosgood G, Paccamonti DL, Baker DG (2005) Factors affecting gestation duration in the bitch. **Theriogenology** 64:242–251.

England GCW, Edward Allen W, Porter DJ (1990) Studies on canine pregnancy using B-mode ultrasound: development of the conceptus and determination of gestational age. **Journal of Small Animal Practice** 31:324-329.

Evans KM, Adams VJ (2010) Proportion of litters of purebred dogs born by caesarean section. **Journal of Small Animal Practice** 51:113-118.

Feliciano MAR, Nepomuceno AC, Crivalero RM, Oliveira MEF, Coutinho LN, Vicente WRR (2013) Foetal echoencephalography and Doppler ultrasonography of the middle cerebral artery in canine fetuses. **Journal of Small Animal Practice** 54:149–152.

Fyfe JC, Al-Tamimi RA, Castellani RJ, Rosenstein D, Goldowitz D, Henthorn PS (2010) Inherited neuroaxonal dystrophy in dogs causing lethal, fetal-onset motor system dysfunction and cerebellar hypoplasia. **The Journal of Comparative Neurology Research in Systems Neuroscience** 518:3771–3784.

Gennisson JL, Deffieux T, Fink M, Tanter M (2013) Ultrasound elastography: principles and techniques. **Diagnostic and Interventional Imaging** 94:487–495.

Gil EMU, Garcia DAA, Giannico AT, Froes TR (2014) Canine fetal heart rate: Do accelerations or decelerations predict the parturition day in bitches? **Theriogenology** 82:933-941.

Gloria A, Contri A, Carluccio A, Robbe D (2018) Blood periovulatory progesterone quantification using different techniques in the dog. **Animal Reproduction Science** 192:179-184.

Groppetti D, Vegetti F, Bronzo V, Pecile A (2015) Breed-specific fetal biometry and factors affecting the prediction of whelping date in the German shepherd dog. **Animal Reproduction Science** 152:117-122.

Guilbaud L, Garabedian C, Di Rocco F, Fallet-Bianco C, Friszer S, Zerah M, Jouannie JM (2014) Limits of the surgically induced model of myelomeningocele in the fetal sheep. **Child's Nervous System** 30:1425-1429.

Hwang M, Riggs BJ, Katz J, Seyfert D, Northington F, Shenandoah R, Burd I, McArthur J, Darge K, Thimm MA, Huisman TAGM (2018) Advanced pediatric neurosonography techniques: contrast-enhanced ultrasonography, elastography, and beyond. **J Neuroimaging** 28:150-157.

Kim HG, Park MS, Lee JD, Park SY (2017) Ultrasound elastography of the neonatal brain: preliminary study. **Journal of Ultrasound in Medicine** 36:1313–1319.

Kornegay JN (1986) Cerebellar Vermian Hypoplasia in Dogs. **Veterinary Pathology** 23:374-379.

Kutzler MA, Mohammed HO, Lamb SV, Meyers-Wallen VN (2003) Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. **Theriogenology**, 60:1187–1196.

Lopate C (2018) Gestational aging and determination of parturition date in the bitch and queen using ultrasonography and radiography. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice** 48:617-638.

Luvoni GC, Beccaglia M (2006) The Prediction of Parturition Date in Canine Pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals** 41:27–32.

Luvoni GC, Grioni A (2000) Determination of gestational age in medium and small size bitches using ultrasonographic fetal measurements. **Journal of Small Practice** 41:292-294.

McLeary RD, Kuhns LR, Barr Jr M (1984) Ultrasonography of fetal cerebellum. **Radiology** 151:439-442.

Michel E, Spörri M, Ohlerth S, Reichler (2011) Prediction of parturition date in the bitch and queen. **Reproduction in Domestic Animals** 46:926-932.

Pass DA, Howell JMC, Thompson RR (1981) Cerebellar malformation in two dogs and a sheep. **Veterinary pathology**, 405-407.

Pretzer SD (2008) Canine embryonic and fetal development: a review **Theriogenology** 70:300-303.

Quarello E, Lacoste R, Mancini J, Melot-Dusseau S, Gorincour G (2016) ShearWave elastography of fetal lungs in pregnant baboons. **Diagnostic and Interventional Imaging** 97:605-610.

Reece EA, Goldstein I, Pihu G, Hobbins JC (1987) Fetal cerebellar growth unaffected by intrauterine growth retardation: A new parameter for prenatal diagnosis. **American Journal of Obstetrics & Gynecology** 157:632-638.

Salomon LJ, AlfIREVIC Z, Berghella V, Bilardo C, Hernandez-Andrade E, Johnsen SL, Kalache K, Leung KY, Malinger G, Munoz H, Prefumo F, Toi A (2011) Practice guidelines for performance of the routine mid-trimester fetal ultrasound scan. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology** 37:116-126.

Silva PDA, Uscategui RAR, Santos VJC, Taira AR, Mariano RSG, Rodrigues MGK, Simões APR, Maronezi MC, Avante ML, Monteiro FOB, Vicente WRR, Feliciano MAR (2018) Acoustic radiation force impulse (ARFI) elastography to asses maternal and foetal structures in pregnant ewes. **Reproduction in Domestic Animals** 54:498-505.

Simões APR, Feliciano MAR, Maronezi MC, Uscategui RAR, Bartlewski PM, Almeida VT, Oh D, Silva PES, Silva LCG, Vicente WRR (2018) Elastographic and echotextural characteristics of foetal lungs and liver during the final 5 days of intrauterine development in dogs. **Animal Reproduction Science** 197:170-176.

Son C, Jeong K, Kim J, Park I, Kim S, Lee C (2001) Establishment of the prediction table of parturition day with ultrasonography in small pet dogs. **Journal of Veterinary Medical Science** 63:715-721.

Su Y, Ma J, Du L, Xia J, Wu Y, Jia X, Cai Y, Li Y, Zhao J, Liu Q (2014) Application of acoustic radiation force impulse imaging (ARFI) in quantitative evaluation of neonatal brain development. **Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology** 42:797-800.

Vinkesteijn ASM, Mulder PGH, Wladimiroff JW (2000) Fetal transverse cerebellar diameter measurements in normal and reduced fetal growth. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology** 15:47–51.

Woodward PJ (2016) Diagnostic imaging: obstetrics. Philadelphia: Elsevier, 1089p.

Wydooghe E, Berghmans E, Rijsselaere T, Soom AV (2013) International breeder inquiry into the reproduction of the English bulldog. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift** 82:38-43.

Zheng XZ, Wu J, Tan XY (2016) A novel approach to assessing fetal tissue stiffness using virtual touch tissue quantification. **Medical Ultrasonography** 18:70–74.

ANEXOS

Reproduction in Domestic Animals

24/10/2019

comparative core. The journal therefore covers obstetrics, neonatology and udder health, and welcomes contributions in these areas. The scope of the journal applies to veterinarians, breeders, and biologists while also being of interest to practitioners of human medicine. Reproduction in Domestic Animals is the official organ of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSAR), and the Spanish Society of Animal Reproduction (ASRA). We encourage the submission of topical results for publication as original papers, reviews (mini-reviews or critical feature articles), or short communications (including case reports and technical notes). Note that Reproduction in Domestic Animals only publishes well-written papers of high scientific quality and significance for the advancement of the field of reproduction, despite them being scientifically sound or properly executed or written. Feature articles or reviews should overview known information or tackle controversial issues in a particular area of the above-mentioned fields that comprise the scope of the journal, with the aim of founding future innovative research. The journal publishes ONLINE-only preliminary communications of results that are of current and extreme interest. Authors interested in preparing a review, a feature article, or a viewpoint article, are invited to discuss the matter with the Editor-in-Chief. Such preliminary contact with the Editor-in-Chief is also advisable when Patent-related matters are included in any manuscript. All papers are subjected to a thorough peer-review by at least two ad-hoc peer referees. Short communications will be subject to accelerated, but very strict refereeing. The publication language is English.

3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

Reproduction in Domestic Animals publishes a number of different article types including:

Original Articles – 5,000 words, including figures, tables and references

Review Articles – 5,000 words, including figures, tables and references.

Short Communications – 1,800 words including figures, tables and references. Short Communications will be subject to accelerated, but very strict refereeing.

Letters to the Editor – comments should be confined to the substance of the paper and the authors of the paper referred to will be offered the opportunity to respond. If the authors do not want to provide a response, or do not provide a response within 30 days, an Editor's footnote will be added to the published Letter to the Editor to note this (e.g. "The authors of [title of previously published paper] offered no comments").

All manuscripts should be double spaced with a font size of 12 points or larger.

Any authors who are concerned that their manuscripts may exceed the recommended page limits should contact the **Editorial Office** prior to submission to discuss options. These will be assessed on a case-by-case basis in consultation with the author and the Editor, and the Editor's decision will be final.

4. PREPARING YOUR SUBMISSION

Manuscripts must be submitted as a Word or rtf file and should be written in English. The manuscript should be submitted in separate files: main text file; figures.

Text File

The text file should be presented in the following order:

- (i) Title;
- (ii) a short running title of less than 70 characters;
- (iii) the full names of the authors;
- (iv) the author's institutional affiliations at which the work was carried out, (footnote for author's present address if different to where the work was carried out);
- (v) summary and keywords;
- (vi) main text;
- (vii) acknowledgements;
- (viii) conflict of interest statement;
- (ix) references;
- (x) tables (each table complete with title and footnotes);

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/rda.13003>

2/10

24/10/2019	Reproduction in Domestic Animals
ADVANCEMENT	 Reproduction in Domestic Animals
Sections	
1. Submission	
2. Aims and Scope	
3. Manuscript Categories and Requirements	
4. Preparing Your Submission	
5. Editorial Policies and Ethical Considerations	
6. Author Licensing	
7. Publication Process After Acceptance	
8. Post Publication	
9. Editorial Office Contact Details	
1. SUBMISSION	Thank you for your interest in Reproduction in Domestic Animals. Note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium. Once you have prepared your submission in accordance with the Guidelines, manuscripts should be submitted online at https://mc.manuscriptcentral.com/rda The submission system will prompt you to use an ORCID (a unique author identifier) to help distinguish your work from that of other researchers. Click here to find out more. Click here for more details on how to use ScholarOne. For help with submissions, please contact rdaoffice@wiley.com We look forward to your submission. Data Protection and Privacy By submitting a manuscript to, or reviewing for, this publication, your name, email address, institutional affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html .
2. AIMS AND SCOPE	Reproduction in Domestic Animals is an international journal publishing original, significant articles on reproduction in domestic animals, laboratory animals, and wildlife, with particular attention to basic, applied and clinical research. Reproduction is considered in a broad context, with its strong disciplinary,

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/rda.13003>

1/10

24/1/2021 9 Reproduction in Domestic Animals (x) figure legends; (x) appendices (if relevant); Figures and supporting information should be supplied as separate files. Title The title should be a short informative title that contains the major key words. The title should not contain abbreviations (see Wiley's best practice SEO tips). Authorship Please refer to the journal's authorship policy in the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on eligibility for author listing. Acknowledgements Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor. In an Acknowledgements section at the end of the paper. Financial and material support should also be mentioned, including the names of any sponsor(s) along with grant number(s) if applicable. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate. Conflict of Interest Statement You will be asked to disclose conflicts of interest during the submission process. See the section 'Conflict of Interest' in the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on what to include in this section. Please ensure that you liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement. The Conflict of interest statement should be included within the main text file of your submission. Contents Each original paper, review or short communication shall contain a short contents (abstract, summary), preferably less than 250 words. The contents should not just recapitulate the results but should state concisely the scope of the work and give the principal findings, avoiding acronyms and references. The contents shall be complete enough for direct use by abstracting services. Keywords Include up to six keywords that describe your paper for indexing purposes and list them in alphabetical order. Keywords should be taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at https://www.nlm.nih.gov/mesh/. Main Text Where possible, the text should be divided into the following sections: Title, Contents, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Conflict of Interest Statement and References. Placement of figures and tables should be indicated in the text. The experimental design should be described in sufficient detail (methods, analyses, statistics, breeds, origin, and management of animals etc.) to allow for repetition of the experiments. References References should be prepared according to the Publication Manual of the American Psychological Association (6th edition). This means in text citations should follow the author-date method whereby the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text, for example, (Jones, 1998). The complete reference list should appear alphabetically by name at the end of the paper. A sample of the most common entries in reference lists appears below. Please note that a DOI should be provided for all references where available. For more information about APA referencing style, please refer to the APA FAQ. Please note that for journal articles, issue numbers are not included unless each issue in the volume begins with page one. Journal article Beers, S. R., & De Bellis, M. D. (2002). Neuropsychological function in children with maltreatment-related posttraumatic stress disorder. <i>The American Journal of Psychiatry</i>, 159, 483-486. doi:10.1176/appi.ajp.159.3.483 https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-7580.2011.02406.x 3/10	24/1/2021 9 Reproduction in Domestic Animals Book Bradley Johnson, S. (1994). <i>Psychoeducational assessment of students who are visually impaired or blind: Infancy through high school</i> (2nd ed.). Austin, TX: Pro-ed. Internet Document Norton, R. (2006, November 4). How to train a cat to operate a light switch [Video file]. Retrieved from https://www.youtube.com/watch?v=jA3KLOXZs Tables Tables should be self contained and complement, but not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols 1, 2, 3, 4, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings. Figure Legends Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement. Preparing Figures Although we encourage authors to send us the highest-quality figures possible, for peer-review purposes we are happy to accept a wide variety of formats, sizes, and resolutions. Click here for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements. Colour Figures Figures submitted in colour may be reproduced in colour online free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white. Cover Image Submissions This journal accepts artwork submissions for Cover Images. This is an optional service you can use to help increase article exposure and showcase your research. For more information, including artwork guidelines, pricing, and submission details, please visit the Journal Cover Images page. Appendices Appendices will be published after the references. For submission they should be supplied as separate files but referred to in the text. Supporting Information Supporting information is information that is not essential to the article but that provides greater depth and background. It is hosted online, and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc. Click here for Wiley's FAQs on supporting information. Note: If data, scripts or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper. General Style Points The following links provide general advice on formatting and style. Abbreviations: In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly and the abbreviation is helpful to the reader. Initially use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-7580.2011.02406.x 4/10
---	---

24/10/2019 Reproduction in Domestic Animals • Units of measurement: Measurements should be given in SI or SI-derived units. Visit the Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) website at http://www.bipm.fr for more information about SI units. • Trade Names: Chemical substances should be referred to by the generic name only. Trade names should not be used. Drugs should be referred to by their generic names. If proprietary drugs have been used in the study, refer to these by their generic name, mentioning the proprietary name, and the name and location of the manufacturer, in parentheses. Wiley Author Resources Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available here. In particular, authors may benefit from referring to Wiley's best practice tips on Writing for Search Engine Optimization. Editing, Translation and Formatting Support Wiley Editing Services can greatly improve the chances of your manuscript being accepted. Offering expert help in English language editing, translation, manuscript formatting and figure preparation, Wiley Editing Services ensures that your manuscript is ready for submission. 5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS Editorial Review and Acceptance The acceptance criteria for all papers is the quality and originality of the research and its significance to our readership. Except where otherwise stated, manuscripts are single-blind peer reviewed. Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determines that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements. Wiley's policy on confidentiality of the review process is available here. Data Sharing and Data Accessibility <i>Reproduction in Domestic Animals</i> recognizes the many benefits of archiving research data. The journal expects you to archive all the data from which your published results are derived in a public repository. The repository that you choose should offer you guaranteed preservation (see the registry of research data repositories at https://www.re3data.org/) and should help you make it findable, accessible, interoperable, and re-usable, according to FAIR Data Principles (https://www.force11.org/group/force11principles). All accepted manuscripts are required to publish a data availability statement to confirm the presence or absence of shared data. If you have shared data, this statement will describe how the data can be accessed, and include a persistent Identifier (e.g., a DOI for the data, or an accession number) from the repository where you shared the data. Authors will be required to confirm adherence to the policy. If you cannot share the data described in your manuscript, for example for legal or ethical reasons, or do not intend to share the data then you must provide the appropriate data availability statement. <i>Reproduction in Domestic Animals</i> notes that FAIR data sharing allows for access to shared data under restrictions (e.g., to protect confidential or proprietary information) but notes that the FAIR principles encourage you to share data in ways that are as open as possible (but that can be as closed as necessary). Sample statements are available here. If published, all statements will be placed in the heading of your manuscript. Data Citation Please also cite the data you have shared, like you would cite other sources that your article refers to, in your references section. You should follow the format for your data citations laid out in the joint Declaration of Data Citation Principles, https://www.force11.org/datacitationprinciples: [dataset] Authors; Year; Dataset title; Data repository or archive; Version (if any); Persistent Identifier (e.g. DOI) Ethics A statement explicitly describing the ethical background to this study and any institutional or national ethical committee approval must be included within the manuscript. Human Studies and Subjects	24/10/2019 Reproduction in Domestic Animals For manuscripts reporting medical studies involving human participants, we require a statement identifying the ethics committee that approved the study, and that the study conforms to recognized standards, for example: Declaration of Helsinki; US Federal Policy for the Protection of Human Subjects; or European Medicines Agency Guidelines for Good Clinical Practice. Images and information from individual participants will only be published where the authors have obtained the individual's free prior informed consent. Authors do not need to provide a copy of the consent form to the publisher, however in signing the author license to publish authors are required to confirm that consent has been obtained. Wiley has a standard patient consent form available. Animal Studies A statement indicating that the protocol and procedures employed were ethically reviewed and approved, and the name of the body giving approval, must be included in the Methods section of the manuscript. We encourage authors to adhere to animal research reporting standards, for example the ARRIVE reporting guidelines for reporting study design and statistical analysis; experimental procedures; experimental animals and housing and husbandry. Authors should also state whether experiments were performed in accordance with relevant institutional and national guidelines and regulations for the care and use of laboratory animals: • US authors should cite compliance with the US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, the US Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, and Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals. • UK authors should conform to UK legislation under the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 Amendment Regulations [SI 2012/2038]. • European authors outside the UK should conform to Directive 2010/63/EU. Clinical Trial Registration We require that clinical trials are prospectively registered in a publicly accessible database and clinical trial registration numbers should be included in all papers that report their results. Please include the name of the trial register and your clinical trial registration number at the end of your abstract. If your trial is not registered, or was registered retrospectively, please explain the reasons for this. Research Reporting Guidelines Accurate and complete reporting enables readers to fully appraise research, replicate it, and use it. We encourage authors to adhere to the following research reporting standards. • CONSORT • SPIRIT • PRISMA • PRISMA-P • STROBE • CARE • COREQ • STARD and TRIPOD • CHEERS • the EQUATOR Network • Future of Research Communications and e-Scholarship (FORCE11) • ARRIVE guidelines • National Research Council's Institute for Laboratory Animal Research guidelines: the Gold Standard Publication Checklist from Hooijmans and colleagues • Minimum Information Guidelines from Diverse Bioscience Communities (MIBBI) website: Biosharing Website • REFLECT statement Species Names
---	--

Upon its first use in the title, abstract and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species and authority) in parentheses. For well-known species, however, scientific names may be omitted from article titles. If no common name exists in English, the scientific name should be used only.

Genetic Nomenclature

Sequence variants should be described in the text and tables using both DNA and protein designations whenever appropriate. Sequence variant nomenclature must follow the current HGVS guidelines; see <http://varnomen.hgvs.org/>, where examples of acceptable nomenclature are provided.

Nucleotide Sequence Data

Nucleotide sequence data can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL or GenBank. It is only necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession-number information is: "These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345". Addresses are as follows:

DNA Data Bank of Japan (DDBJ) <http://www.ddbj.nig.ac.jp>

EMBL Nucleotide Sequence Submissions <http://www.ebi.ac.uk>

GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Protein Sequence Data

Protein sequence data should be submitted to either of the following repositories:

• Protein Information Resource (PIR) <http://pir.georgetown.edu>

• SWISS-PROT <http://www.ebi.ac.uk/seqdata/protein>

Conflict of Interest

Reproduction in Domestic Animals requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to, patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships. The Conflict of Interest statement should be included within the main text file of your submission.

Funding

Authors should list all funding sources in the Acknowledgments section. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open Funder Registry for the correct nomenclature: <http://www.crossref.org/fundingdata/registry.html>

Authorship

The list of authors should accurately illustrate who contributed to the work and how. All those listed as authors should qualify for authorship according to the following criteria:

- 1) Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data;
- 2) Been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content;
- 3) Given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content; and
- 4) Agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical help, collation of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript.

Additional authorship options

Joint first or senior authorship: In the case of joint first authorship a footnote should be added to the author listing, e.g. 'X and Y should be considered joint first author' or 'X and Y should be considered joint senior author.'

ORCID

As part of our commitment to supporting authors at every step of the publishing process, *Reproduction in Domestic Animals* requires the submitting author (only) to provide an ORCID ID when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete. Find more [information](#).

Publication Ethics

This journal is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE). Note this journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read our 'Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors' [here](#). Wiley's Publication Ethics Guidelines can be found at <https://authorservices.wiley.com/ethics-guidelines/index.html>

6. AUTHOR LICENSING

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

Authors may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or [OnlineOpen](#) under the terms of a Creative Commons License.

General information regarding licensing and copyright is available [here](#). To review the Creative Commons License options offered under OnlineOpen, please [click here](#). (Note that certain funders mandate that a particular type of CC license has to be used; to check this please [click here](#).)

Self-Archiving definitions and policies. Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions. Please [click here](#) for more detailed information about self-archiving definitions and policies.

Open Access fees: If you choose to publish using OnlineOpen you will be charged a fee. A list of Article Publication Charges for Wiley journals is available [here](#).

Funder Open Access: Please [click here](#) for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

Accepted article received in production

When your accepted article is received by Wiley's production production team, you (corresponding authors) will receive an email asking you to login or register with [Author Services](#). You will be asked to sign a publication licence at this point.

Once your paper is typeset you will receive email notification of the URL from where to download a PDF typeset page proof, associated forms and full instructions on how to correct and return the file. Please note that you are responsible for all statements made in your work, including changes made during the editorial process and thus you must check your proofs carefully. Note that proofs should be returned 48 hours from receipt of first proof.

Accepted Articles

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online very soon after acceptance, prior to copyediting or typesetting. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF

24/10/2019 Reproduction in Domestic Animals format only, are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked, and are indexed by PubMed. After publication of the final version article (the article of record), the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. Accepted Articles will be indexed by PubMed; submitting authors should therefore carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript so it is correct for indexing. Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated. Proofs Authors will receive an e-mail notification with a link and instructions for accessing HTML page proofs online. Page proofs should be carefully proofread for any copyediting or typesetting errors. Online guidelines are provided within the system. No special software is required, all common browsers are supported. Authors should also make sure that any renumbered tables, figures, or references match text citations and that figure legends correspond with text citations and actual figures. Proofs must be returned within 48 hours of receipt of the email. Return of proofs via e-mail is possible in the event that the online system cannot be used or accessed. Early View The journal offers rapid speed to publication via Wiley's Early View service. Early View (Online Version of Record) articles are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue. Note there may be a delay after corrections are received before your article appears online, as Editors also need to review proofs. Once your article is published on Early View no further changes to your article are possible. Your Early View article is fully citable and carries an online publication date and DOI for citations. 8. POST PUBLICATION Access and sharing When your article is published online: • You receive an email alert (if requested). • You can share your published article through social media. • As the author, you retain free access (after accepting the Terms & Conditions of use, you can view your article). • The corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to your article. You can now order print copies of your article (instructions are sent at proofing stage or use the below contact details). Email www.sharidan.com/wiley/asc Now is the time to start promoting your article. Find out how to do that here. Wiley also helps you measure the impact of your research through our specialist partnerships with Kudos and Altmetric. 9. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS rdsoffice@wiley.com Author Guidelines updated 18th February 2019 Tools  Submit an Article  Browse free sample issue https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/14300231/homepage/authors.html 9/10	24/10/2019 Reproduction in Domestic Animals Get content alerts Subscribe to this journal More from this journal News Wiley Job Network Journal Information Jobs About Wiley Online Library Privacy Policy Terms of Use Cookies Accessibility Help & Support Contact Us Opportunities Subscription Agents Advertisers & Corporate Partners Connect with Wiley The Wiley Network Wiley Press Room Copyright © 1999-2019 John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/14300231/homepage/authors.html 10/10
--	--

APÊNDICES

APÊNDICE A

EXPERIMENTO LÊ – ANIMAL NÚMERO _____

Nome: _____ Tutor: _____ Telefone: () _____

Raça	Idade	Nº de gestações	Nº cesáreas	Dosagem de P4

Reação ao fio de sutura? Qual? _____

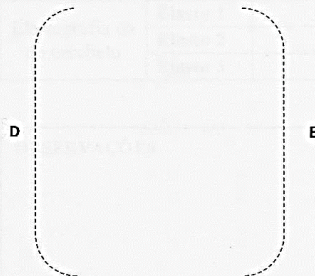
Intercorrências em partos anteriores: _____

Dias de inseminação: ____ / ____ / ____ - ____ / ____ / ____ - ____ / ____ / ____ - ____ / ____ / ____

1º EXAME – DIA 34 (____ / ____ / ____ às ____) Número estimado de vesículas: _____

		FETO 1	FETO 2	FETO 3	Média
DBP (mm)					
DA (mm)					
FC (bpm)					
TN (mm)					
Elastografia da massa cerebral	Elasto 1				
	Elasto 2				
	Elasto 3				

Posicionamento dos fetos



OBSERVAÇÕES

CÁLCULOS

Dias gestacionais:

Dias para o parto:

2º EXAME – DIA 49 (____ / ____ / ____ às ____)

		FETO 1	FETO 2	FETO 3	Média
DBP (mm)					
DA (mm)					
FC (bpm)					
DTC (mm)					
Elastografia da massa cerebral	Elasto 1				
	Elasto 2				
	Elasto 3				
Elastografia da do cerebelo	Elasto 1				
	Elasto 2				
	Elasto 3				

OBSERVAÇÕES**CÁLCULOS**

Dias gestacionais:

Dias para o parto:

3º EXAME – DIA 60 (____ / ____ / ____ às ____)

		FETO 1	FETO 2	FETO 3	Média
DBP (mm)					
DA (mm)					
FC (bpm)					
DTC (mm)					
Elastografia da massa cerebral	Elasto 1				
	Elasto 2				
	Elasto 3				
Elastografia da do cerebelo	Elasto 1				
	Elasto 2				
	Elasto 3				

OBSERVAÇÕES**CÁLCULOS**

Dias gestacionais:

Dias para o parto:

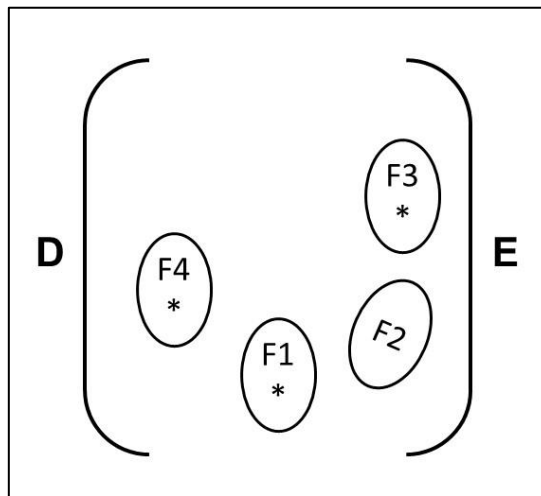
APÊNDICE B

Figura 1. Desenho esquemático da disposição dos fetos no abdômen da matriz. Nesse exemplo, está ilustrada uma gestação de quatro fetos e os três fetos avaliados estão identificados com asterisco (*). D:lado direito do abdômen; E:lado esquerdo do abdômen; F:feto.