

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

**ULTRASSONOGRAFIA EM ALTA DEFINIÇÃO (HD) NO
DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO GESTACIONAL DE
CADELAS BRAQUICEFÁLICAS**

Marjury Cristina Maronezi

Médica Veterinária

2019

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

**ULTRASSONOGRAFIA EM ALTA DEFINIÇÃO (HD) NO
DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO GESTACIONAL DE
CADELAS BRAQUICEFÁLICAS**

Marjury Cristina Maronezi

Orientador: Prof. Dr. Marcus Antonio Rossi Feliciano

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Andres Ramirez Uscategui

Coorientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em Cirurgia
Veterinária**

2019

M354u Maronezi, Marjury Cristina

Ultrassonografia em alta definição (HD) no diagnóstico e acompanhamento gestacional de cadelas braquicefálicas / Marjury Cristina Maronezi. -- Jaboticabal, 2019 67 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências

Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Marcus Antônio Rossi Feliciano

Coorientador: Ricardo Andres Ramirez Uscategui

1. Cães. 2. Ultrassonografia. 3. Embriologia. 4. Prenhez. 5. Desenvolvimento fetal. I.

Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ULTRASSONOGRAFIA EM ALTA DEFINIÇÃO (HD) NO DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO GESTACIONAL DE CADELAS BRAQUICEFÁLICAS

AUTORA: MARJURY CRISTINA MARONEZI

ORIENTADOR: MARCUS ANTÔNIO ROSSI FELICIANO

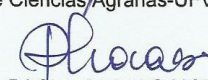
COORDENADOR: WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE

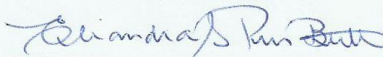
COORDENADOR: RICARDO ANDRES RAMIREZ USCATEGUI

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


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


Prof. Dr. PAULO FERNANDES MARCUSSO
Instituto de Ciências Agrárias-UFVJM / Unai/MG


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


Dra. ELIANDRA ANTONIA PIRES BUTTLER
Médica Veterinária Autônoma / Ribeirão Preto/SP


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

Jaboticabal, 01 de março de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Marjury Cristina Maronezi - nascida em Francisco Beltrão (PR), 25 de agosto de 1990, filha de Maria José Gaiovicz e Lauder Maronezi. Graduada em Medicina veterinária pela Universidade Estadual do Centro Oeste - Unicentro (2009 - 2013). Durante a graduação foi bolsista do Programa Institucional de Ações Extensionistas. Mestre em Cirurgia Veterinária com linha de pesquisa em ultrassonografia pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP/Jaboticabal com bolsa da FAPESP. Atualmente é Doutoranda do programa de Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP/Jaboticabal com linha de pesquisa em ultrassonografia e atua em novas técnicas ultrassonográficas para cães e gatos, sob orientação do Prof. Dr. Marcus Antnio Rossi Feliciano e coorientação dos professores Dr. Ricardo Andres Ramirez Uscategui e Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente.

*A Deus
Meus pais,
Maria José e Lauderí
Meus irmãos
E meu amor,
Everton*

AGRADECIMENTOS (ERRATA)

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre presente em minha vida, guiando a minha trajetória e aos meus amigos de luz que estão ao meu lado minuto a minuto me inspirando confiança, fé e abnegação.

A minha mãe Maria José, a qual sou eternamente grata, por ter tornado tudo isso possível e pelo apoio e amor incondicional durante todos os dias de minha vida. Ao meu pai Lauder pela confiança e incentivo. Aos meus irmãos Júnior e Maria Gabriela por todo amor e carinho. Ao meu padrasto Miguel Valeriano por ser um segundo pai e por toda dedicação direcionada a nossa família, a minha madrastra Carla pelo carinho durante essa trajetória.

Ao meu amor Everton Diego da Silva por embarcar comigo nessa trajetória, por ser o meu maior incentivador e meu protetor.

Ao meu orientador e grande amigo Marcus Antônio Rossi Feliciano, pela dedicação, paciência, ensinamentos, conselhos, por acreditar em mim, nesse trabalho e me proporcionar a oportunidade de ingressar na pós graduação, sem você nada disso seria possível.

Ao meu coorientador Ricardo Andres Ramirez Uscategui, por nos acompanhar durante todo esse trabalho, nos transmitindo segurança e encorajamento. Obrigada por confiar no meu trabalho e por toda ajuda em todos os perrengues.

Ao grande mestre professore Wilter Ricardo Russiano Vicente, pela credibilidade desde sempre e por ser nosso grande exemplo.

As minhas amigas Letícia, Priscila Silva e Migalha, as quais juntas formamos um quarteto imbatível. Aquelas que não me abandonaram nas horas difíceis e que fizeram os meus dias de trabalho mais divertidos. Agradeço pela parceria nos trabalhos do laboratório (equipe faz tudo), por toda paciência e amizade que desenvolvemos nesses últimos tempos

A minha parceira de experimento e amiga, Ana Paula Simões que embarcou comigo nessa caminhada e tornou tudo mais fácil e divertido. Esta caminhada jamais seria a mesma sem você.

Agradeço a Fapesp pelo suporte financeiro no projeto temático (processo 2017/14957-6).

Ao CNPq pela concessão da bolsa e auxílio (processo 141098/2016-3).

Quero agradecer aos meus amigos da família Obstetrícia e Reprodução, que estiveram sempre presentes durante essa jornada, Giovanna, Marcus, Ana Paula, Priscila Silva, Letícia, Beatriz (Migalha), Luciana, Renata, Ricardo Ramirez, Vivian, Mariana Kako, Victor, Edson e Lúcia.

Aos professores Eliandra, Luciana, Paulo e Paola por aceitarem participar da minha banca por todas as considerações na avaliação deste projeto, que certamente contribuíram muito para o engrandecimento do trabalho.

Aos amigos e colegas que ajudaram no desenvolvimento desse trabalho, Ricardo, Marcus, Ana Paula, Giovanna, Priscila Silva, Priscila del Aguila, Michelle, Letícia, Beatriz, Marina, Mariana Kako, Renata, Victor, Vivian, Felipe e Diego (Tofu).

À Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, por ter me acolhido e contribuído para minha formação profissional.

Aos tutores que confiaram seus animais sob nossos cuidados durante esse projeto e por toda confiança.

E por fim, a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra contribuíram para este trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO -	iv
ABSTRACT –	v
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	2
2.1 Desenvolvimento embrionário	2
2.2 Ultrassonografia gestacional.....	3
2.3 Ultrassonografia de alta definição.....	3
3. Referências.....	8
CAPÍTULO 2 – Avaliação do desenvolvimento embrionário e fetal mediante a ultrassonografia de alta definição (HD) em cadelas braquicefálicas.....	13
Abstract	13
Resumo	13
Introdução.....	14
Material e Métodos	15
<i>Aspectos éticos e animais</i>	15
<i>Avaliação do ciclo reprodutivo</i>	15
<i>Ultrassonografia de alta definição</i>	16
<i>Análise estatística</i>	17
Resultados.....	17
Discussão	28
Conclusão.....	33

Referências.....	34
CAPÍTULO 3 – Biometria gestacional em cadelas braquicefálicas utilizando a ultrassonografia de alta definição (HD).....	39
Abstract	39
Resumo	40
Introdução.....	40
Material e Métodos	41
<i>Aspectos éticos e animais</i>	41
<i>Avaliação do ciclo reprodutivo</i>	41
<i>Ultrassonografia de alta definição e ecobiometria</i>	42
<i>Análise estatística</i>	43
Resultados.....	43
Discussão.....	49
Conclusão.....	51
Referências.....	52
CAPÍTULO 4 – Elastografia ARFI e ultrassonografia pulmonar de fetos caninos com hidropsia	57
Abstract	57
Resumo	58
Introdução.....	58
Descrição do caso	59
Discussão	63
Conclusão.....	64
Referências.....	66

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

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

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado **"Ultrassonografia em alta definição (HD) para diagnóstico e acompanhamento gestacional de cadelas braquicefálicas"**, protocolo nº 3652/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcus Antonio 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 junho 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 06 de abril de 2017.

Vigência do Projeto	10/04/2017 a 07/02/2020
Espécie / Linhagem	Canino / <i>Canis lupus familiaris</i>
Nº de animais	15
Peso / Idade	5 a 25 Kg
Sexo	Fêmeas
Origem	Serviço da Obstetria Veterinária e criadores

Jaboticabal, 06 de abril de 2017.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

ULTRASSONOGRAFIA EM ALTA DEFINIÇÃO (HD) NO DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO GESTACIONAL DE CADELAS BRAQUICEFÁLICAS

RESUMO – O objetivo deste estudo foi realizar o estudo da ultrassonografia de alta definição (HD) para descrever a formação dos tecidos materno, fetais e embrionários. Doze fêmeas braquicefálicas, consideradas hípidas, com peso de 7 a 13kg e idade de 1 a 4 anos, foram utilizadas. Realizou-se exame ultrassonográfico modo B e HD das fêmeas gestantes, diariamente, após oito dias da inseminação artificial, até a data de parição. Utilizou-se aparelho ultrassonográfico ACUSON S2000/SIEMENS e softwares específicos. Foram obtidas medidas das estruturas embrionárias e fetais como o diâmetro da vesícula embrionária, comprimento do embrião, diâmetro biparietal e abdominal, comprimento e altura renal, comprimento do fêmur, úmero, escápula, rádio e tíbia, espessamento da parede estomacal, comprimento da adrenal, além de medidas cardíacas. Adicionalmente, foram descritos os achados ultrassonográficos das estruturas materno, embrionárias e fetais. Os resultados significativos ($P < 0.001$), obtidos para diâmetro lateral da vesícula gestacional ($r^2 = 81,8\%$), comprimento do embrião ($r^2 = 85,7\%$), diâmetro biparietal ($r^2 = 99,1\%$), diâmetro abdominal ($r^2 = 97,2\%$), espessura da parede gástrica ($r^2 = 86,9\%$), comprimento do fêmur ($r^2 = 96,6\%$), comprimento do rádio ($r^2 = 97,5\%$), comprimento do úmero ($r^2 = 96,5\%$), comprimento da escápula ($r^2 = 95,8\%$), comprimento da tíbia ($r^2 = 97,3\%$), comprimento ($r^2 = 95,8\%$) e altura ($r^2 = 96,0\%$) do rim, comprimento da adrenal ($r^2 = 89,6\%$), comprimento ($r^2 = 93,0\%$) e altura ($r^2 = 91,5\%$) do coração dos fetos caninos mostraram correlação significativa com os dias gestacionais e permitem a estimativa da idade gestacional com acurácia variável em diferentes períodos. Após análise estatística descritiva, se apresentam e descrevem os dias em que a gestação, placentação e cada um dos sistemas orgânicos embrionárias e fetais foi detectado. A gestação confirmou-se precocemente do 10º ao 13º dia, o embrião apareceu no 17º dia, batimentos cardíacos no 18º dia, rins no 24º dia entre outras observações, foi possível identificar e categorizar todas as estruturas maternas, embrionárias e fetais. Conclui-se que o exame ultrassonográfico HD, pode detectar precocemente o processo gestacional, o desenvolvimento de sistemas orgânicos embrionários e fetais, além da formação de alguns órgãos que nunca foram descritos por meio da ultrassonografia. As medidas ecobiométricas permitem a estimativa da idade gestacional em diferentes períodos com acurácia.

Palavras-chave: canino, prenhez, embrião, desenvolvimento fetal, ecobiometria,

HIGH DEFINITION ULTRASOUND OF THE DIAGNOSTIC EVALUATION OF PREGNANCY IN BRACHYCEPHALIC BITCHES.

ABSTRACT – The purpose of this study was to perform the study of high resolution (HD) ultrasonography in addition to the formation of some organs that have never been described in the literature. Twelve healthy females, weighing 7-13 kg and age 1-4 years, of brachycephalic races were used. Conventional ultrasound and HD ultrasonography of the fetuses were performed daily after eight days of artificial insemination until parturition using the ACUSON S2000/SIEMENS ultrasound apparatus and specific softwares. Measurements were made of embryonic and fetal structures, embryonic vesicle diameter, embryo length, biparietal diameter and abdominal; renal length and height; femur, humerus, scapula, radius and tibia length; thickening of the stomach wall; adrenal length; measurements, the description of maternal and fetal findings was analyzed. The significant results ($P < 0.001$), obtained for lateral diameter of the gestational vesicle ($r^2 = 81.8\%$), embryo length ($r^2 = 85.7\%$), biparietal diameter ($r^2 = 99.1\%$), abdominal diameter ($r^2 = 97.2\%$), gastric wall thickness ($r^2 = 86.9\%$), femoral length ($r^2 = 96.6\%$), radius length ($r^2 = 97.5\%$), humera length ($r^2 = 96.5\%$), length of the scapula ($r^2 = 95.8\%$), length of the tibia ($r^2 = 97.3\%$), length ($r^2 = 95.8\%$) and height ($r^2 = 96.0$ ($r^2 = 93.0\%$) and height ($r^2 = 91.5\%$) of the heart of the canine fetuses showed a significant correlation with the gestational days and allowed the estimation of gestational age with variable accuracy and in different periods. After descriptive statistical analysis, we present and describe the days in which gestation, placentation and each of the embryonic and fetal organ systems were detected. Gestation was confirmed early in the 10th to the 13th day, the embryo appeared on the 17th day, heart beats on the 19th day, kidneys on the 24th day among other observations, it was possible to identify and categorize all maternal, embryonic and fetal structures. It is concluded that HD ultrasonography can detect the gestational process early, the development of embryonic and fetal organ systems, and the formation of some organs that have never been described by ultrasonography. The ecobiometric measures allow the estimation of gestational age in different periods with accuracy

Keywords: canine, pregnancy, embryo, fetal development, ecobiometry

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. Introdução

A ultrassonografia obstétrica é o método de imagem mais utilizado na reprodução veterinária, considerada uma técnica precisa, segura, não-invasiva e de baixo custo (NYLAND; MATTOON, 2015). É usada para realizar diagnóstico gestacional, avaliar as estruturas materno-fetais, avaliar o desenvolvimento e viabilidade fetal, identificar defeitos congênitos e outras anormalidades gestacionais e ainda prever a idade gestacional e data de parto (AISSI; SLIMANI, 2008; LOPATE, 2008; DAVIDSON; BAKER, 2009; LAMM; MAKLOSKI, 2012).

O avanço da tecnologia médica e evolução dos equipamentos de ultrassom têm fornecido gradualmente melhora na qualidade das imagens obtidas nos exames de ultrassonografia, diretamente relacionados aos transdutores de maior frequência que proporcionam uma avaliação com nitidez e definição excelentes no exame de mulheres e animais de companhia. Esta evolução propiciou o crescimento dos estudos clínicos gestacionais na espécie canina e tem permitido realizar diagnósticos de alterações fetais (DAVIDSON; BAKER, 2009; FELICIANO et al., 2013; GIL et al., 2014).

Na espécie humana, a ultrassonografia de alta definição (HD - high definition) vem sendo utilizada para avaliação intravascular, dermatológica e musculoesquelética (HATA, 2013; TENKUMO, 2013; ARAUJO et al., 2015; CHIN et al., 2016; SONG et al., 2016). No acompanhamento gestacional a ultrassonografia HD tem demonstrado ser um método promissor (ARJUN et al., 2016). As qualidades favoráveis são consequências da capacidade em revelar detalhes mais precisos e avaliação mais completa e acurada quando comparada com as técnicas predecessoras (BONILLA-MUSOLES, 2013; ARJUN et al., 2016).

A ecobiometria faz parte da avaliação ultrassonográfica gestacional e é uma técnica importante para avaliar quantitativamente o desenvolvimento das estruturas gestacionais, realizar a apuração anatômica dos fetos e calcular com acurácia a idade gestacional (MIRANDA; DOMINGUES, 2010). Esta avaliação permite também detectar subdesenvolvimento fetal em caninos o que a torna método importante para diferenciar alterações reprodutivas e antecipar intervenções terapêuticas quando necessárias (FELICIANO et al., 2013).

Considerando a inovação da ultrassonografia HD, com este estudo objetivou-se avaliar a eficácia da técnica no diagnóstico e acompanhamento gestacional em cadelas braquicefálicas. Caracterizar os tecidos materno e fetais e realizar ecobiometria dos tecidos para prever a idade gestacional.

2. Revisão de Literatura

2.1 Desenvolvimento embrionário

A embriologia compreende o conhecimento sobre o início da vida e as mudanças morfológicas durante o desenvolvimento pré-natal (MOORE; PERSAUD, 2008). A biologia dos oócitos e dos embriões na espécie canina é diferenciada das outras espécies de mamíferos e ainda é amplamente desconhecida (REYNAUD et al., 2005; LEE et al., 2008; CHASTANT-MAILLARD et al., 2010). A ovulação é espontânea e possui início aproximadamente 48 horas após o pico de LH. O oócito necessita passar por modificações, na morfologia nuclear e citoplasmática, a fim de se tornar competente de ser fertilizado e apto a se desenvolver como embrião (LEE et al., 2008).

O período em que acontecem as principais etapas do desenvolvimento embrionário pré-implantação na espécie canina difere entre os autores. Isso ocorre devido aos métodos utilizados para determinar a ovulação, como dosagem sérica de progesterona ou dias após o acasalamento (REYNAUD et al., 2006; APPARÍCIO et al., 2015). Os embriões permanecem no oviduto, em média, nove dias da gestação, entram no útero em estágio de mórula ou blastocisto inicial, entre o 16º e 20º dia após a ovulação, os blastocistos eclodem e o processo de implantação inicia-se dois dias depois (CONCANNON et al., 2001; REYNAUD et al., 2005; CHASTANT-MAILLARD et al., 2010).

Há poucos estudos na literatura sobre o desenvolvimento do embrião canino (PIERI et al., 2015). A maioria desses trabalhos se baseiam nas características ultrassonográficas, porém com divergências entre os autores sobre a data de aparecimento de cada estrutura embrionária e fetal (MORIYOSHI et al., 1996; ENGLAND; RUSSO, 2006; PRETZER, 2008). Dessa forma, alguns autores propõem

estudos *in vivo*, para melhor determinar esses eventos fisiológicos (YEAGER; CONCANNON, 1995; HAŞEGAN et al., 2012; PIERI et al., 2015).

O embrião se desenvolve em sequência cefalocaudal, começando pela cabeça e fechamento do tubo neural (PRETZER, 2008). Entre 21 e 22 dias os embriões caninos, apresentam um corpo em forma de “C”, saco vitelínico, o âmnion já envolve o embrião com uma pequena quantidade de líquido em relação aos anexos embrionários, o coração primitivo, placa neural e linha primitiva estão presentes (ROBALLO et al., 2013; PIERI et al., 2015). Com aproximadamente 22 e 25 dias o embrião possui globo óptico com pigmentação, tubo neural, proeminência mandibular, arcos faríngeos, formação de membros pélvicos e torácicos, definição de cabeça e tronco, o coração exhibe câmaras atriais e ventriculares, há pulmão primitivo, fígado, desenvolvimento inicial do intestino e o rim primitivo está formado, a partir dos metanefros e mesonefros (PIERI et al., 2015).

A traqueia, cavidade oral, esôfago, estômago e intestino primitivo são observados com 26 dias. Entre 28 e 32 dias de gestação o embrião canino apresenta cavidade nasal bem desenvolvida, sistema respiratório formado, membros torácicos e pélvicos com separação de dígitos, sistema urogenital com início da formação de gônadas. O sistema cardiovascular completo é notado com 32 dias e na data de 35 dias já é considerado feto com o corpo totalmente formado (SORRIBAS, 2006; PIERI et al., 2015).

2.2 Ultrassonografia gestacional

O primeiro relato em veterinária, da utilização da ultrassonografia gestacional foi em ovelhas (LINDAHL, 1966). Desde então, tornou-se possível a utilização deste método para diagnóstico da gestação em todas as espécies domésticas (GARCIA et al., 1993; YOTOV et al., 2011). Atualmente, é considerada a técnica de imagem mais utilizada na reprodução veterinária, pois é simples, confiável, não-invasiva e de baixo custo (NYLAND; MATTOON, 2015).

Existem técnicas ultrassonográficas que já foram descritas na literatura veterinária para avaliação de cadelas gestantes: modo A, doppler, modo B, 3D/4D, alta resolução e elastografia ARFI (acoustic radiation force impulse) (FELICIANO et al., 2007; KUSTRITZ, 2005; SIMÕES et al., 2018).

O modo A ou ultrassom de amplitude profunda identifica a presença de fluido por meio da oscilação de traçados. Este exame não pode definir a origem do fluido como definitivamente uterino e não permite a avaliação da viabilidade ou do número fetal (FELICIANO et al., 2007).

A técnica doppler permite importante avaliação da circulação materno-fetal e auxilia no diagnóstico de alterações fetais caninas (NAUTRUP 1998). O doppler em cores permite avaliar a presença, direção, característica do fluxo sanguíneo e diferenciação entre fluxos rápidos e lentos. Por sua vez o doppler pulsado ou espectral fornece um sinal audível, identificando batimentos cardíacos fetais, mas não estima o número de fetos ou informações mais exatas para a avaliação da viabilidade fetal (FELICIANO et al., 2007; KUSTRITZ, 2005). Ademais, o doppler triplex possibilita a avaliação de índices vasculares da circulação materno-fetal, o qual facilita o acompanhamento gestacional e análise do crescimento fetal e o fluxo sanguíneo uteroplacentário (MIRANDA; DOMINGUES 2010).

O modo B é a ultrassonografia convencional em tempo real, que permite a avaliação do *status* gestacional, viabilidade fetal, investigação uterina e de estruturas abdominais extra-reprodutivas (KUSTRITZ, 2005). Este método se baseia na reflexão de ondas sonoras através do tecido, de acordo com a estrutura a ser avaliada, sendo que as ondas ultrassônicas são refletidas de volta ao transdutor, que as transforma em uma escala de cinza, observada no monitor (WORTSMAN, 2010). A ultrassonografia convencional possibilita executar diagnóstico gestacional, visualizar diferentes tecidos materno-fetal e acompanhar sua caracterização de aspectos ecogênicos e ecotexturais, além de promover a determinação de medidas por meio da ecobiometria dos tecidos (MIRANDA; DOMINGUES, 2010; FELICIANO et al., 2015).

Os exames ultrassonográficos volumétricos, 3D e 4D, baseiam-se na reconstrução digital de imagem bidimensional, sendo o primeiro exame volumétrico estático e o segundo exame em tempo real (FELICIANO et al., 2015), ambos auxiliam no diagnóstico de anormalidades congênitas e dismorfologia, em humanos (BLASS et al., 2000). Em cadelas gestantes, o primeiro estudo utilizando estas técnicas foi realizado por Feliciano et al. (2007) que concluíram ser possível que este exame identifique anomalias fetais incompatíveis com a sobrevivência dos filhotes ou que

possam causar distocias. As limitações destas técnicas referem-se à sua aplicação experimental, decorrente da falta de conhecimento de como executar uma varredura de qualidade, do alto custo dos equipamentos, além dos artefatos produzidos pelos movimentos respiratórios (FELICIANO et al., 2015).

A introdução de transdutores com frequência superior a 7,5 MHz nos equipamentos ultrassonográficos originou o ultrassom de alta resolução, sendo que a frequência da onda ultrassônica está associada à resolução de imagem gerada, quanto maior a frequência das ondas emitidas pelo transdutor, maior a resolução espacial e consequentemente a visualização de estruturas próximas (BARCAU et al., 2015). Em obstetrícia veterinária, a utilização da ultrassonografia de alta resolução tem sido utilizada para o diagnóstico gestacional em cadelas (GARCIA; FELICIANO, 2015). Como desvantagem ou limitação desta técnica, as imagens de alta resolução têm um campo de visão limitado e a definição da imagem não apresenta grande nitidez, dificultando a visibilização de algumas estruturas fetais e correto diagnóstico de alterações fetais mais sutis (TREECE et al., 2003).

A elastografia ARFI é uma técnica de imagem segura e não invasiva, que fornece medidas quantitativas e qualitativas da rigidez dos tecidos com uma variabilidade interobservador reduzida. Essa técnica utiliza pulsos acústicos de curta duração para produzir deslocamentos no tecido examinado. Para avaliação qualitativa, este método utiliza impulsos acústicos curtos e de alta intensidade para deformar os elementos do tecido e criar um mapa estático (elastograma) de rigidez tecidual relativa (GODDI et al., 2012). O estudo quantitativo ARFI utiliza um impulso acústico primário em direção a uma região de interesse, promovendo a formação de ondas de pressão em propagação capaz de deformar os tecidos, captando a velocidade de propagação das ondas de pressão (cisalhamento). A velocidade de propagação e a atenuação das ondas estão relacionadas com a rigidez e viscoelasticidade do tecido. As ondas apresentam maior velocidade em tecidos rígidos (COMSTOCK, 2011).

Estudos recentes mostraram que a elastografia ARFI é aplicável e viável para a avaliação do tecido pulmonar fetal em babuínos (QUARELLO et al., 2016) e humanos (ZHENG et al., 2016), tecido pulmonar e hepático de cães (SIMÕES et al., 2018) e ovinos (SILVA, 2018). Os parâmetros observados também se correlacionam

com o desenvolvimento gestacional dessas espécies. Nos fetos humanos, a ultrassonografia é realizada para avaliar a maturidade e as anomalias dos tecidos pulmonares (ZHENG et al., 2016).

A ecobiometria é uma técnica importante que consiste em mensurações de tecidos maternos e fetais para identificar a idade gestacional e estimativa da data do parto. Adicionalmente, esta técnica ultrassonográfica possibilita estudar as estruturas gestacionais e avaliação anatômica dos fetos ao longo do desenvolvimento. Sendo assim é adequada e importante para monitorar cadelas gestantes, pois auxilia na detecção precoce de disfunções fetais e maternas, as quais podem prejudicar a viabilidade gestacional (MIRANDA; DOMINGUES, 2010; FELICIANO et al., 2015).

2.3 Ultrassonografia de Alta definição

Dentre as novas técnicas de imagem que têm sido elaboradas em obstetrícia humana, ressalta-se a ultrassonografia de alta definição. Esta técnica tem capacidade de fornecer detalhes mais precisos das imagens obtidas, o que melhora a qualidade do exame, fornecendo dados ultrassonográficos superiores e com nitidez rica, quando comparada às outras técnicas (BONILLA- MUSOLES, 2013), ou seja, um método de alta resolução com alta definição.

O método HD é composto por software específico que processa os pulsos elétricos obtidos pelo efeito pizelétrico e os transforma em imagem digital de alta qualidade, permitindo excelente resolução e definição, além de adequada profundidade e melhor visualização das estruturas avaliadas (BONILLA- MUSOLES, 2013). Estas afirmações sobre a qualidade da imagem decorrem da representação digital das imagens obtidas pelo método, que apresenta quantidade de número de pixels bem elevado (1080) comparado aos outros métodos (0 a 255), o que relaciona-se diretamente com a melhora considerável da qualidade e nitidez da imagem (PAPIER et al., 2000; RICHARDSON et al., 2001).

Em medicina, a ultrassonografia de alta definição vem sendo usada para identificações de lesões em nervos periféricos e estruturas adjacentes, bem como a realização de bloqueio anestésico guiado pelo ultrassom (nervo ciático e poplíteo) e em avaliações oftálmicas (KARMAKAR et al., 2013.; TAN; YEO, 2011).

Estudo realizado por Araujo et al. (2015) com US HD em mulheres gestantes, verificou que o método possibilitou com notória propriedade a capacidade de visibilizar

as estruturas fetais com singular riqueza de detalhes, contribuindo para um acurado diagnóstico gestacional precoce e correto acompanhamento do desenvolvimento fetal ultrassonográfico, quando comparado aos outros métodos ultrassonográficos. Neste contexto, de acordo com Bonilla-Musoles (2013) a qualidade da imagem ultrassonográfica é extremamente importante para se realizar de modo precoce o diagnóstico da gestação, além de detectar a origem e natureza das malformações fetais em humanos.

O método em HD fornece uma avaliação clara do desenvolvimento embrionário, propicia aquisição de imagens com definições precisas, promove aumento na acurácia dos diagnósticos gestacionais normais e anormais em humanos (HATA, 2013). Em veterinária não foram encontrados relatos na literatura do uso desta técnica.

3. Referências

- AISSI, A.; SLIMANI, C. Time of Initial Detection of Fetal Structures e Anatomic Differentiation by Using B-Mode Ultrasound Examination in Bitches. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.11, n.13, p.1750-1753, 2008.
- ARAUJO, J. E.; SANTANA, E. F. M.; NARDOZZA, L. M. M.; MORON, A. F. Avaliação do embrião/feto ao longo da gestação por meio da ultrassonografia tridimensional com o software HD live: ensaio iconográfico. **Radiol Bras [online]**. v.48, n.1, p. 52-55, 2015.
- APPARÍCIO, M.; VICENTE, W. R. R. Embryo development and transfer in bitches. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.39, n.1, p.146-149, 2015.
- BARCAUI, E. O.; CARVALHO, A.C.P.; PIÑEIRO-MACEIRA, J. BARCAUI, C.B.; MORAES, H. Estudo da anatomia cutânea com ultrassom de alta frequência (22 MHz) e sua correlação histológica. **Radiologia Brasileira**, v.48, n.5, 2015.
- BLASS, H.G.; EIK-NES, S.H.; BERG, S. Three dimensional fetal ultrasound. **Baillieres Best Pract. Clinl. Obstet. Gynaecol**, v.14, p.611-627, 2000.
- BONILLA-MUSOLES, F.; RAGA, F.; CASTILLO, J. C.; BONILLA, F. J.; CLIMENT, M. T.; CABALLERO, O. High Definition Real-Time Ultrasound (HDLive) of embryonic e Fetal Malformations before Week. **Journal of Ultrasound in Obstetrics e Gynecology**, v. 7, p. 1-8, 2013.
- CHASTANTD-MAILLARD, S.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; SAINT-DIZIER, M.; CHODKIEWICZ, M.; REYNAUD, K. Embryo biotechnology in the dog: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.1049-2056, 2010.
- CONCANNON, P.; TSUTSUI, T.; SHILLE, V. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. **Journal of reproduction and fertility**, v.57, p.169–179, 2001.
- DAVIDSON, A. P.; BAKER, T. W. Reproductive ultrasound of the bitch and queen. **Top Companion Anim Med**, v. 24, n. 2, p. 55-63, 2009.

ENGLAND, G. C.; RUSSO, M. Ultrasonography characteristics of early pregnancy failure in bitches. **Theriogenology**, v.66, p.1694–1698, 2006.

FELICIANO, M. A. R.; MAZZU, L. A. L.; LEITE, C. A. L.; JUNQUEIRA, L. A. Ultrasonografia bidimensional convencional, de alta resolução e tridimensional no acompanhamento da gestação em cadela. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.5, p.1333-1337, 2007.

FELICIANO, M. A. R.; NEPOMUCENO, A. C.; CRIVELARO, R. M.; OLIVEIRA, M. E. F.; COUTINHO, L. N.; VICENTE, W. R. R. Fetal echoencephalography e Doppler ultrasonography of the middle cerebral artery in canine fetuses. **Journal of Small Animal Practice**, v. 54, p. 149-152, 2013.

FELICIANO, M. A. R.; GARCIA, P. H. S.; VICENTE, W. R. R. Introdução à Ultrassonografia. In: FELICIANO, M. A.; CANOLA, J. C.; VICENTE, W. R. R. **Diagnóstico por Imagem em Cães e Gatos**. São Paulo: MedVet, v, 1. p. 53-57. 2015.

GARCIA, A.; NEARY, M. K.; KELLY, G. R.; PIERSON, R. A. Accuracy of ultrasonography in early pregnancy diagnosis in the ewe. **Theriogenology**, v. 39, n. 4, p. 847-861, 1993.

GARCIA, D.A.A.; FELICIANO, M.A.R. Sistema Reprodutor feminino. In: FELICIANO, M.A.R.; CANOLA, J.C.; VICENTE, W.R.R. **Diagnóstico por Imagem em Cães e Gatos**. São Paulo: MedVet. p.336-366, 2015.

GIL, E. M. U.; GARCIA, D. A. A.; FROES, T. R. In utero development of the fetal intestine: Sonographic evaluation e correlation with gestational age e fetal maturity in dogs. **Theriogenology**, v. 82, n. 7, p. 933-941, 2014.

GODDI, A.; BONARDI, M.; ALESSI, S. Breast elastography: a literature review. **Journal of Ultrasound**, v.15, n.3, p.192-198, 2012.

HATA, T. HD live rendering image at 6 weeks of gestation. **J Med Ultrasonics**. v.40, p.495-6, 2013.

HOLST, P. A.; PHEMISTER, R. D. The prenatal development of the dog. preimplantation events. **Biology of Reproduction**, v.5, p.771-779, 1971.

KUSTRITZ, M. V. R. Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog. **Theriogenology**, v.64, p.755-65, 2005.

LAMM, C. G.; MAKLOSKI, C. L. Current advances in gestation e parturition in cats e dogs. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 42, n. 3, p. 445-456, 2012.

LEE, H. S.; YIN, X. J, JIN, Y. X.; KIM, N. H.; CHO, S. G.; BAE, I. H.; KONG, I. K. Germinal vesicle chromatin configuration and meiotic competence is related to the oocyte source in canine. **Animal Reproduction Science**, v.103, p.336-347, 2008.

LOPATE, C. Estimation of gestational age and assessment of canine fetal maturation using radiology and ultrasonography: A review. **Theriogenology**, v. 70, p.397–402, 2008.

LINDAHL, I. L. Detection of pregnancy in sheep by means of ultrasound. **Nature**, v. 212, n. 5062, p. 642-643, 1966.

LUVONI, G. C.; CHIGIONI, S.; BECCAGLIA, M. Embryo production in dogs: from in vitro fertilization to cloning. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.286-290, 2006.

MATTOON, J. S.; NYLAND, T. G. **Small Animal Diagnostic Ultrasound**. 3. ed. St Louis: Elsevier, 2015.

MIRANDA, S. A.; DOMINGUES, S. F. S. Conceptus ecobiometry and triplex Doppler ultrasonography of uterine and umbilical arteries for assessment of fetal viability in dog. **Theriogenology**, v.74, p. 608–617, 2010.

MOORE, K. L.; PERSAUD, V. **Embriologia Clínica**, 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

MORIYOSHI, M.; WAKI, Y.; NAKAO, T.; KAWATA, K. Observation of the growth process of a beagle embryo and fetus by ultrasonography. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.58, p.443–445, 1996.

NAUTRUP, C, P. Doppler ultrasonography of canine maternal and fetal arteries during normal gestation. **Journal of Reproduction Fertility**, v.112, p. 301-314, 1998.

PAPIER, A.; PERES, M.R.; BOBROW, M.; BHATIA, A. The digital imaging system e dermatology. **Int J Dermatol**. v. 39, p.561-75. 2, 2000.

PIERI, N. C. G.; SOUZA, A. F.; CASALS, J. B.; ROBALLO, K. C. S.; AMBROSIO, C. E.; MARTINS, D. S. Comparative Development of Embryonic Age by Organogenesis in Domestic Dogs and Cats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n.4, p. 625–631, 2015.

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

REYNAUD, K.; Fontbonne. A.; Marseloo, N.; Thoumire, S.; Chebrout, M.; Lesegno, C. V.; Chastant-Maillard, S. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. **Reproduction**, v.130, p.193-201, 2005.

RICHARDSON, M. D.; KARCHER, D. E.; PURCELL, L. C. Quantifying turfgrass cover using digital image analysis. **Crop Science**, Madison, v.41, p.1.884-1.888, 2001.

ROBALLO, K. C.; ERCOLIN, A. C.; CASALS, J. B.; PIERI, N. C.; BARRETO, R. S.; ILLERA, M.; MARTINS, D. S.; MIGLINO, M. A.; AMBROSIO, C. E. Domestic carnivore's development: detection of Oct-4, a pluripotency marker, in pharyngeal arches. **Reproduction in Domestic Animals**, v.48, p. 41–43, 2013.

SILVA, P. D. A.; USCATEGUI, R. A. R.; SANTOS, V. J. C.; TAIRA, A. R.; MARIANO, R. S. G.; RODRIGUES, M. G. K.; SIMÕES, A. P. R.; MARONEZI, M. C.; AVANTE, M. L.; VICENTE, W. R. R.; FELICIANO, M. A. R. Qualitative and quantitative ultrasound attributes of maternal-foetal structures in pregnant ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 3, p. 725-732, 2018.

SIMÕES, A. P. R.; FELICANO, M. A. R.; MARONEZI, M. C.; USCATEGUI, R. A. R.; BARTLEWSKI, P. M.; ALMEIDA, V. T.; OH, D.; SILVA, P. E. C.; SILVA, L. C. G.; VICENTE, W. R. R. Elastographic and echotextural characteristics of foetal lungs and liver during the final 5 days of intrauterine development in dogs. **Animal Reproduction Science**, v. 197, p. 170-176, 2018.

SORRIBAS, C. E. **Atlas de Reprodução canina**, 1. ed. São Caetano do Sul: Interbook, 2006.

TAN, T. C, YEO, C. J, SMITH, E. W. High definition ultrasound as diagnostic adjunct for incomplete carpal tunnel release. **Hand Surg**, v. 16, p. 289-94, 2011.

TENKUMO, C.; TANAKA, H.; ITO, T. UKETA, E.; MORI, N.; HANAOKA, U.; KANENISHI, K.; EO, M.; HATA, T. Three-dimensional HDlive rendering images of the TRAP sequence in the first trimester: reverse end-diastolic umbilical artery velocity in a pump twin with an adverse pregnancy outcome. **J Med Ultrasonics**. v.40, p.293-296., 2013.

TREECE, G. M.; GEE, A. H.; PRAGER, R. W.; CASH, C. J. C. BERMAN, L.H. High-definition freehand 3-D ultrasound. **Ultrasound in Medicine e Biology**. v.29, n.4, p.529-546, 2003.

TSUTSUI, T. Studies on the reproduction in the dog on cleavage and transport of fertilised ova in the oviduct. **The Japanese journal of animal reproduction**, v.21, p.70-75, 1975.

WORTSMAN, X.; WORTSMAN, J. Clinical usefulness of variable-frequency ultrasound in localized lesions of the skin. **J Am Acad Dermatol**, v.62, n.2, p.247-56, 2010.

YOTOV, S. A.; ATANASOV, A.; GEORGIEV, P. Determination of foetal sex in buffaloes through a single sonographic examination. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 14, n. 1, p. 39-44, 2011.

CAPÍTULO 2 – Ultrassonografia em alta definição (HD) na avaliação do desenvolvimento embrionário e fetal em cadelas braquicefálicas.

Abstract

The objective of this study was to perform high-definition ultrasound (HD) examination of gestation of pregnant brachycephalic bitches, describing daily findings of maternal-fetal structures. Twelve healthy brachycephalic females, weighing 7 to 13 kg and aged from 1 to 4 years, were used. Females were evaluated daily for HD from the 8th day after artificial insemination until the day of delivery. After descriptive statistical analysis, we present and describe the days in which gestation, placentation and each of the embryonic and fetal organ systems were detected. Gestation was confirmed early from the 10th to the 13th day, the embryo appeared on the 17th day, heart beats on the 18th day, kidneys on the 24th day among other observations, it was possible to identify and categorize all maternal, embryonic and fetal structures. It was concluded that with the sonographic examination HD, it was possible to detect the gestational process early, the development of embryonic and fetal organ systems, and the description of some fetal tissues never evaluated by ultrasound.

Keywords: canine, pregnancy, embryo, fetal development.

Resumo

O objetivo deste estudo foi realizar o exame ultrassonográfico em alta definição (HD) da gestação de cadelas de raças braquicefálica, descrevendo achados diários das estruturas materno-fetais. Foram utilizadas 12 fêmeas braquicefálicas sadias, peso de 7 a 13 kg e com idade de 1 a 4 anos. As fêmeas foram avaliadas diariamente pela HD, desde o 8º dia após inseminação artificial até o dia do parto. Após análise estatística descritiva, se apresentam os dias em que a gestação, placentação e cada um dos sistemas orgânicos embrionários e fetais foram detectados. A gestação confirmou-se precocemente do 10º ao 13º dia, o embrião apareceu no 17º dia, batimentos cardíacos no 18º dia, rins no 24º dia entre outras observações, foi possível identificar e categorizar todas as estruturas maternas, embrionárias e fetais. Conclui-se que com o exame ultrassonográfico HD, foi possível detectar precocemente o processo gestacional, o desenvolvimento de sistemas orgânicos embrionários e fetais, além da

descrição de alguns tecidos fetais nunca avaliados pela ultrassonografia como pâncreas, adrenais, esôfago, traqueia, timo e bula timpânica.

Palavras Chaves: canino, gestação, ultrassonografia

Introdução

O exame ultrassonográfico tem grande aplicabilidade na rotina obstétrica de pequenos animais, especificamente na gestação das fêmeas possibilitando a realização do diagnóstico gestacional, monitoração da cadela prenhe, determinação da viabilidade fetal, acompanhamento do desenvolvimento dos órgãos e identificação de anormalidades gestacionais (JARRETA, 2004; PRETZER, 2008; LAMM; MAKLOSKI, 2012).

O primeiro relato da utilização da ultrassonografia gestacional em veterinária foi em ovelhas (LINDAHL, 1966) e desde então tem sido amplamente utilizada em outras espécies domésticas (GARCIA et al., 1993; YOTOV et al., 2011).

Atualmente, com o advento de tecnologias avançadas e aparelhos ultrassonográficos com melhor qualidade de imagem com transdutores de alta resolução, houve um progresso singular nos estudos em cadelas gestantes, permitindo avaliar de forma detalhada a morfologia dos conceptos e acompanhar adequadamente as diferentes particularidades do desenvolvimento dos tecidos materno-fetais (DAVIDSON; BAKER, 2009; FELICIANO et al., 2013; GIL et al., 2015; FELICIANO et al., 2015). Adicionalmente, este avanço tecnológico, tem permitido precocidade considerável na detecção dos achados ultrassonográficos indicativos de gestação em cadelas (FELICIANO et al., 2013; GIL et al., 2014a; GIL et al., 2018)

Em medicina, métodos ultrassonográficos de alta definição (HD) tem sido aplicados para avaliação da gestação (ARAUJO et al., 2015; HATA, 2013; TENKUMO, 2013), avaliação intravascular (CHIN et al., 2016; SONG et al., 2016), dermatológica e musculoesquelética (ARJUN et al., 2016). Em gestantes, a ultrassonografia HD (US HD) permite identificar componentes embrionários e fetais com maior riqueza de detalhes em todos os trimestres da gestação e a qualidade da sua imagem proporciona características reais e fidedignas da normalidade e anormalidades envolvidas no processo gestacional (ARAUJO et al., 2015; HATA, 2013; TENKUMO,

2013). Na medicina veterinária, ainda não há descrições literárias sobre a utilização da técnica HD para a avaliação gestacional de animais.

Em vista da aplicabilidade descrita para técnica ultrassonográfica em mulheres gestantes e ausência de estudos em animais, acredita-se que o método possibilitará descrever com maior riqueza de detalhes e precocidade o aparecimento e desenvolvimento das estruturas materno-fetais em cadelas gestantes. Sendo assim, objetivou-se avaliar a aplicabilidade da ultrassonografia HD no estudo gestacional de cadelas braquicefálicas.

Material e Métodos

Aspectos éticos e animais

Este estudo foi realizado com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP/Jaboticabal (n.3652/17). Doze fêmeas das raças Buldogue francês (n= 8), Pug (n = 2) e Shih-tzu (n = 2), com peso entre 7 e 13 kg, idade entre 1 e 4 anos e consideradas saudáveis pela ausência de sinais ao exame físico, hemograma, perfil bioquímico e exame ultrassonográfico do trato reprodutor, foram selecionadas para esse estudo. As fêmeas eram provenientes de canis da região com os quais o departamento mantém parceria e após consentimento livre e esclarecimento por parte dos tutores para a participação dos seus animais no estudo.

Oito dias após a inseminação artificial, as fêmeas foram alojadas em canis individuais, com camas apropriadas para gestantes, ventilação, luz e temperatura controlada e alimentadas até o parto com ração comercial para gestantes e água *ad libitum*. Para prevenir estresse foi implementado passeios diários.

Para auxiliar na escolha do melhor momento de inseminação artificial, os responsáveis pelo canil foram treinados para detectar os primeiros sinais de proestro. A fase do ciclo estral foi confirmada pelos sinais de cio (aceitação da copulação pela fêmea) e pela citologia vaginal (FELICIANO et al., 2013; SOCHA et al., 2012). Após esta confirmação, realizava-se a inseminação artificial com sêmen de machos selecionados e considerados aptos à reprodução após exame clínico e andrológico.

Ultrassonografia HD

Para os exames ultrassonográficos utilizou-se aparelho ACUSON S2000® (Siemens, Munique, Alemanha) e transdutor digital de alta resolução (18L6HD), com frequência de 17,0 MHz.

As cadelas passaram por condicionamento de 15 dias antes da inseminação, realizando-se diariamente uma simulação do exame ultrassonográfico, todas as fêmeas foram preparadas com tricotomia antes do exame. Transcorridos oito dias da inseminação, os animais eram conduzidos ao laboratório de ultrassom, posicionados em decúbito dorsolateral esquerdo e aplicado gel de ultrassom para otimizar a aquisição das imagens.

Para avaliação ultrassonográfica seguiu-se o protocolo descrito por Gil et al. (2014b), com o objetivo de avaliar todo o abdômen e o maior número de fetos possíveis por gestante. As estruturas materno-fetais foram avaliadas em planos longitudinal e dorsal. O ganho, foco e profundidade de penetração foram ajustados para cada feto durante o exame, visando aperfeiçoar a qualidade da imagem.

A data da inseminação artificial foi considerada o dia zero e o tempo gestacional confirmado retrospectivamente pela data de parição, considerando período normal de 57 a 63 dias (CONCANNON et al., 1983). Durante a avaliação ultrassonográfica a idade gestacional era estimada em dias de gestação, utilizando as recomendações de Yeager et al. (1992) e Mattoon e Nyland (2015) combinado com a avaliação do desenvolvimento intestinal e renal relatado por Gil et al. (2014a e 2018). Os achados obtidos foram divididos em dois momentos, de acordo com a fase de desenvolvimento gestacional: fase embrionária - até o 35º dia; e fase fetal - do 35º dia até o nascimento (PRETZER, 2008). Em ambas buscou-se: 1) visibilização da vesícula gestacional; 2) detecção e caracterização das estruturas embrionárias e fetais; 3) estudo de funções rudimentares (batimentos cardíacos, peristaltismo); e 4) avaliação do desenvolvimento de tecidos gestacionais descritos.

Análise estatística

Durante o exame ultrassonográfico eram cuidadosamente registrados os achados das estruturas materno-fetais identificadas, assim como os sinais de função rudimentar dos mesmos. Posteriormente foram categorizados estes achados na

identificação de cada uma das estruturas maternas, embrionárias ou fetais e calculados o dia médio de identificação, o intervalo de confiança ao 95% e o desvio padrão quando se trata de funções rudimentares. Estas análises descritivas foram realizadas com a ajuda do software R® (Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria).

Resultados

Das 12 cadelas gestantes, 68 fetos foram avaliados e todos nasceram saudáveis, sem sinais de qualquer anormalidade. O tamanho médio das ninhadas foi de 5 ± 3 filhotes e o tempo médio de gestação de 61 ± 3 dias (mínimo de 59 e máximo de 63).

Na Tabela 1 e 2 estão descritos os achados ultrassonográficos gestacionais HD e seus respectivos dias de identificação.

Tabela 1. Estruturas e funções embrionárias observados ao exame ultrassonográfico HD de cadelas braquicefálicas, dia de gestação (DG) no qual foram identificadas e intervalo de confiança 95% (IC-95%).

Estrutura	DG	IC-95%
Vesícula Gestacional	10	10 - 13
Embrião aderido à parede da vesícula gestacional	17	17 - 18
Movimento das fibras cardíacas	18	18 - 20
Cordão umbilical	21	21 - 22
Placa neural	21	21 - 23
Resquício canal vertebral (Linha primitiva)	21	21 - 23
Saco vitelínico	22	21 - 22
Alantoide	22	21 - 22
Mesonéfro	24	24 - 27
Coração	24	24 - 26
Desenvolvimento inicial dos membros	25	25 - 26
Placentação	25	25 - 26
Fígado	30	29 - 31
Definição de cabeça e rafe cerebral	27	27 - 29
Plexo coroide	27	27 - 29
Centro de ossificação	27	27 - 28
Órbitas oculares	27	27 - 29
Estômago repleto por conteúdo anecoico	27	27 - 28
Diferenciação entre tórax e abdômen	30	30 - 32
Movimentação embrionária	29	27 - 29
Cristalino	30	30 - 32
Pulmão	30	29 - 31
Fêmur	30	30 - 32
Coração (septos e câmaras)	30	30 - 34
Reflexo de sucção	31	30 - 32
Bexiga	31	31 - 32
Esqueleto fetal	32	32 - 33
Coluna vertebral	32	31 - 33
Cauda	33	33 - 34
Dígitos	33	33 - 34
Diferença de ecogenicidade entre Pulmão Fígado	34	34 - 36
Aorta e veia cava caudal	34	34 - 36

Tabela 2. Estruturas e funções fetais observados ao exame ultrassonográfico HD de cadelas braquicefálicas, dia de gestação (DG) no qual foram identificadas e intervalo de confiança 95% (IC-95%).

Estrutura	DG	IC-95%
Esôfago	35	35 - 37
Traqueia	35	35 - 37
Carina	35	35 - 37
Baço	35	35 - 37
Osso nasal	35	35 - 36
Palato	35	35 - 37
Pelve renal	36	36 - 38
Vesícula Biliar	36	35 - 37
Vasos hepáticos	36	35 - 37
Articulações	36	35 - 36
Escápula	36	36 - 37
Costelas	36	36 - 38
Coração (câmaras atriais e ventriculares)	37	37 - 40
Diferenciação córticomedular e divertículo renal	37	37 - 39
Úmero	38	38 - 39
Tíbia	38	38 - 39
Rádio	38	38 - 40
Estrutura amorfa de intestino	38	38 - 41
Adrenais	39	39 - 43
Sexagem fetal	39	39 - 48
Língua	39	39 - 41
Processos alveolares	40	40 - 42
Timo	40	40 - 42
Pâncreas	41	41 - 44
Estratificação intestinal	43	43 - 46
Arcabouços timpânicos	43	43 - 46
Estratificação estomacal	43	43 - 45
Diferenciação de Lobos hepáticos	43	40 - 43
Diferenciação entre fígado e baço	43	43 - 46
Peristaltismo intestinal focal	47	47 - 50
Estômago com conteúdo ecogênico	47	47 - 50
Motilidade intestinal generalizada	53	51 - 53

A gestação foi confirmada entre o 10° e 13° dia gestacional, pela detecção das vesículas gestacionais como estruturas de conteúdo anecoico circundado por parede fina hiperecoica. Os embriões foram visualizados pela primeira vez no 17° ao 18° dia, caracterizados como pequenas estruturas ecogênicas pediculadas, localizadas excentricamente na vesícula gestacional, sendo inicialmente identificados como estruturas hiperecoicas amorfas em contato com a parede interna da vesícula gestacional, sem movimentos e sem frequência cardíaca (Figura 1). Ao 18° ao 20° dia começaram a serem identificadas as movimentações das fibras cardíacas, aproximadamente 129 ± 7 bat/min, com aumento gradativo até chegar e estabilizar em média 224 ± 7 bat/min quatro dias após a primeira detecção.

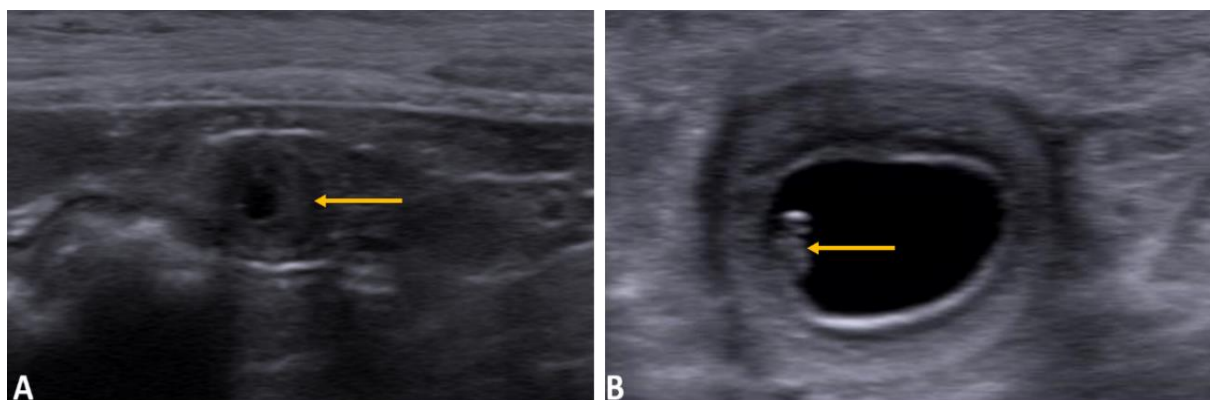


Figura 1: Imagem ultrassonográfica HD correspondente a fase embrionária em cães braquicefálicos. (A) Vesícula gestacional de 10 dias (seta); (B) Embrião canino ao 17° dia gestacional (seta).

Ao 21° e 22° dia, a membrana vitelínica foi visualizada como duas linhas ecogênicas paralelas ou circulares, separadas por conteúdo anecoico. A membrana alantoide foi observada como uma membrana hipoecoica circundando o embrião e saco vitelínico, o cordão umbilical foi detectado como uma linha hiperecoica na região central do embrião. Nesta fase as vesículas gestacionais apresentaram duas camadas hiperecoicas, correlacionadas com as porções placentárias (Figura 2). A partir do 25° dia gestacional esta estrutura sacular modificou seu formato de esférico para oblongo.

Com 21 dias foi identificada nos conceitos, placa neural e linha primitiva, onde a notocorda se origina, verificada como estrutura tubular de parede hiperecoica e conteúdo anecoico, correspondente ao tubo neural primitivo (futura medula espinhal)

(Figura 2B). A cabeça e pescoço foram reconhecidos ao 27º dia, com a cabeça determinada como foco hipoecoico, seguido do plexo coroide cerebral, bilobado e hiperecoico, ainda em estágio exordial, circundado por ventrículo cerebral anecoico. O plexo coroide teve aumento gradativo e com 40 dias já ocupava grande parte dos hemisférios cerebrais com formato de “borboleta” sendo possível visualizar tronco cerebral. A calota craniana também apresentou aumento progressivo ao decorrer das semanas gestacionais (Figura 3). O arcabouço timpânico foi detectado como estruturas ecogênicas, ovais e arredondada 43º dia.

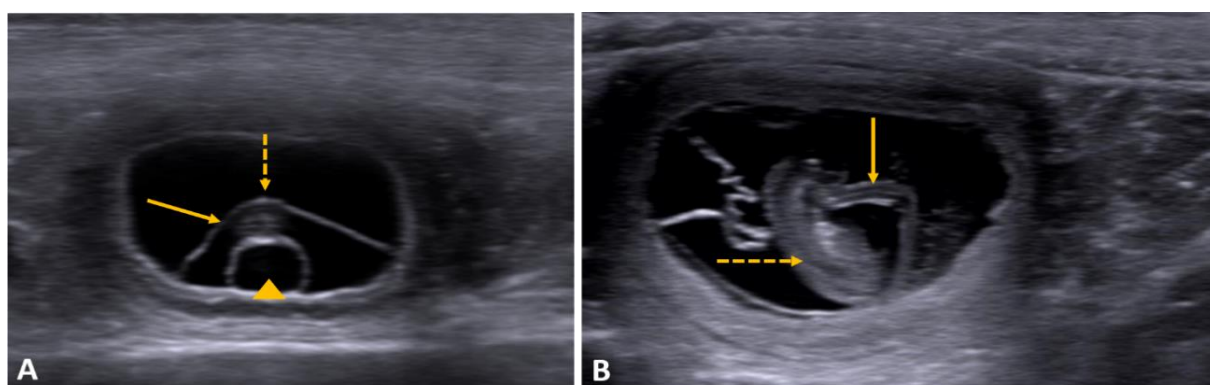


Figura 2: Ultrassonografia HD de embriões caninos ao 21º dia de gestação. (A) Embrião em corte transversal, presença de membrana alantoide (seta) e membrana vitelínica (cabeça de seta); (B) Embrião em corte longitudinal, presença de tubo neural (seta curta), cordão umbilical (seta longa) e placentação.

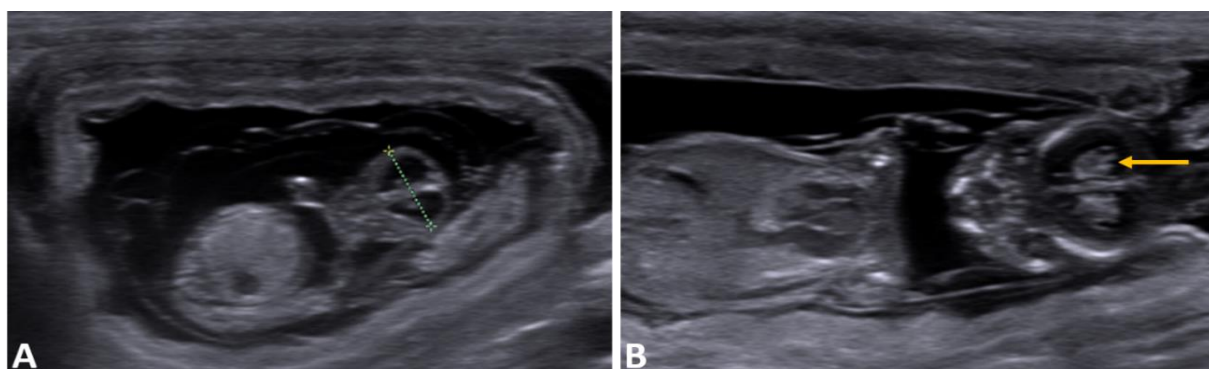


Figura 3: Ultrassonografia HD de embrião e feto canino. (A) Presença de massa cerebral em estágio inicial com 27 dias; (B) Feto com 36 dias de gestação, massa cerebral em formato de “borboleta”.

A identificação inicial dos membros pélvicos e torácicos ocorreu do 25º ao 26º dia. Dois dias após o aparecimento dos botões de membros foi visualizado áreas hiperecoicas, sem sombra acústica, compatíveis a centro de ossificação de alguns ossos faciais e diáfises dos ossos longos. O fêmur foi o primeiro osso longo a ser reconhecido ao 30º dia, escápula ao 36º dia e o rádio, úmero e tíbia ao 38º dia de gestação, todos apresentando crescimento progressivo, e na última semana gestacional eram facilmente distinguíveis.

O esqueleto axial foi visibilizado como estruturas hiperecoicas com sombras acústicas, sendo a coluna vertebral, subdividida em suas regiões e estruturas evidente ao 32º dia. A cauda foi definida ao mesmo tempo que os membros eram identificáveis e os dígitos ao 33º dia. O osso nasal e palato foram notados ao 35º dia, as costelas e coluna cervical eram facilmente identificáveis e ocasionavam sombras acústicas junto com a identificação das articulações dos membros ao 36º dia e já mandíbula, maxila e processos alveolares apresentaram definição no 40º dia de gestação das fêmeas.

As movimentações fetais foram identificadas em todos os fetos ao 29º dia e abrangeram flexão dorsoventral, extensão dos membros, cabeça e pescoço. Com 31 dias detectou-se reflexo de sucção, porém apenas no 39º dia foi possível distinguir com nitidez a abertura da boca e a língua. Ao 27º dia as órbitas oculares foram caracterizadas por áreas anecoicas, circulares e com 30 dias foi identificado o cristalino.

O estômago foi inicialmente evidenciado como uma área focal anecoica ao 27º dia com diferentes graus de distensão e ao 43º dia o lúmen estomacal estava repleto por conteúdo anecoico com presença de sedimento hiperecoico, sendo possível identificar estratificação parietal com identificação da mucosa. Todavia, aos 47 dias os segmentos apresentaram melhor definição e o conteúdo luminal era totalmente ecogênico. O esôfago também foi identificado ao 35º dia como estrutura tubular anecoica acompanhando toda a extensão cervicotorácica até a inserção no estômago (Figura 4 e 5). A partir do 41º dia o pâncreas foi detectado como estrutura hipoecoica com relação aos tecidos adjacentes, abaixo do estômago (Figura 6B).

As estruturas intestinais foram identificadas primeiramente em região caudal ao fígado reconhecidas por uma área hiperecogênica uniforme, a partir do 38º. Com 43 dias alguns segmentos intestinais apresentaram melhor definição e estratificação das

camadas. No 47º dia os segmentos intestinais já estavam bem definidos com conteúdo intraluminal hiperecoico, superfície mucosa, sua interface e peristaltismo focal. Ao 53º dia os fetos já apresentavam peristaltismo intestinal em todos os segmentos e parede intestinal nitidamente definida e estratificada (Figura 7 e 8).

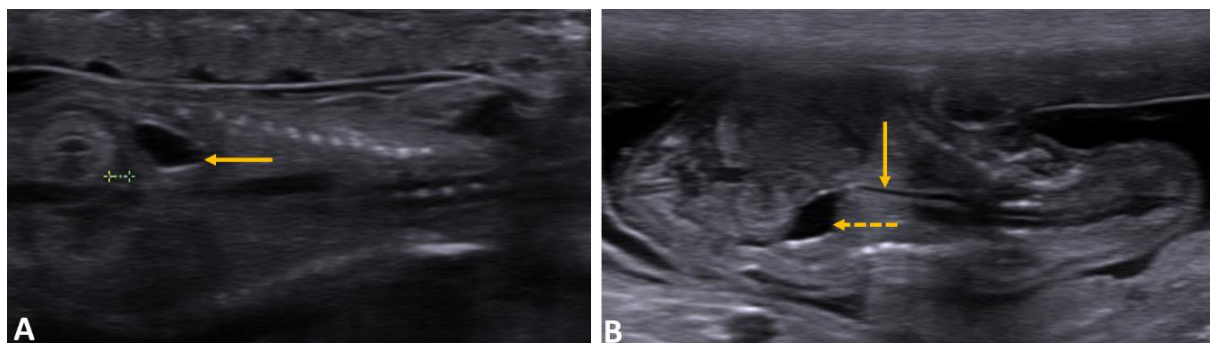


Figura 4: Imagem do desenvolvimento inicial do estômago. (A) Identificação do estômago com 27 dias de gestação (seta); (B) Presença de esôfago tubular (seta) até inserção no estômago (seta pontilhada) ao 35 dia.

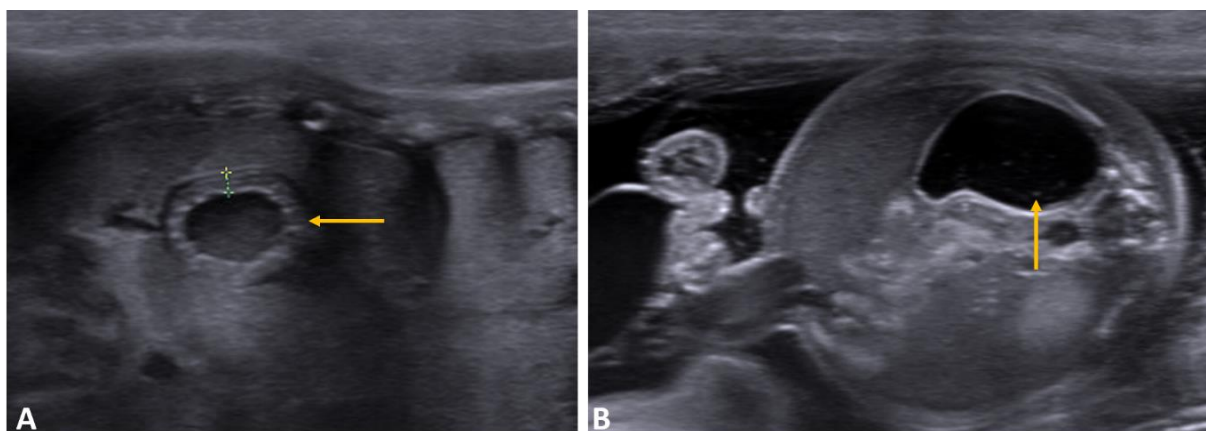


Figura 5: Imagem do desenvolvimento do estômago. (A) Estômago (seta) com estratificação parietal da parede (entre cursores) ao 43º dia; (B) Lúmen estomacal com presença de ecos ecogênicos (seta) ao 47º dia.

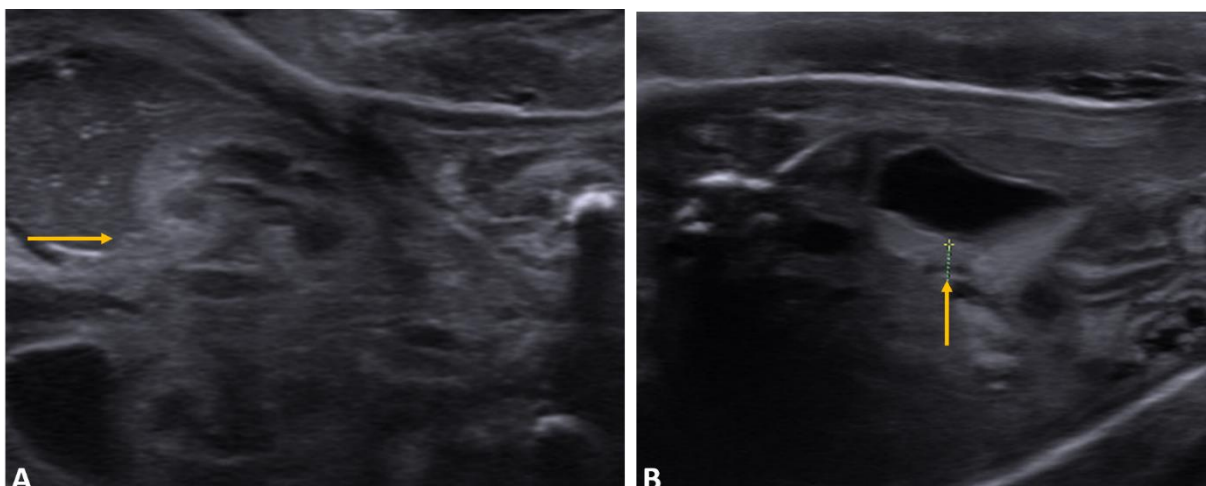


Figura 6: Ultrassonografia de fetos caninos com 41 dias de gestação. (A) Adrenal (seta); (B) Pâncreas (seta).

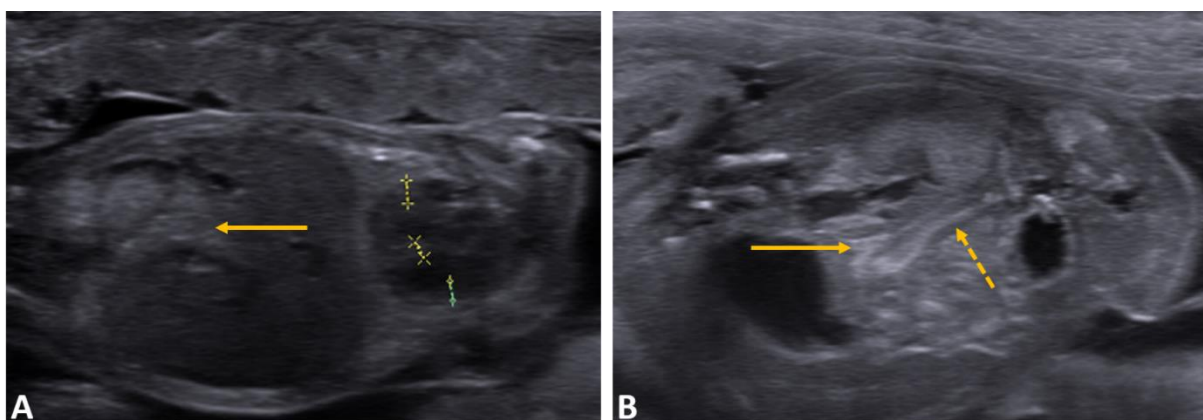


Figura 7: Imagens do desenvolvimento intestinal (A) Intestino primitivo ao 38° dia (seta); (B) Segmentos intestinais mais desenvolvidos (seta) com presença de início da diferenciação das camadas da parede do intestino (seta pontilhada) ao 43° dia.

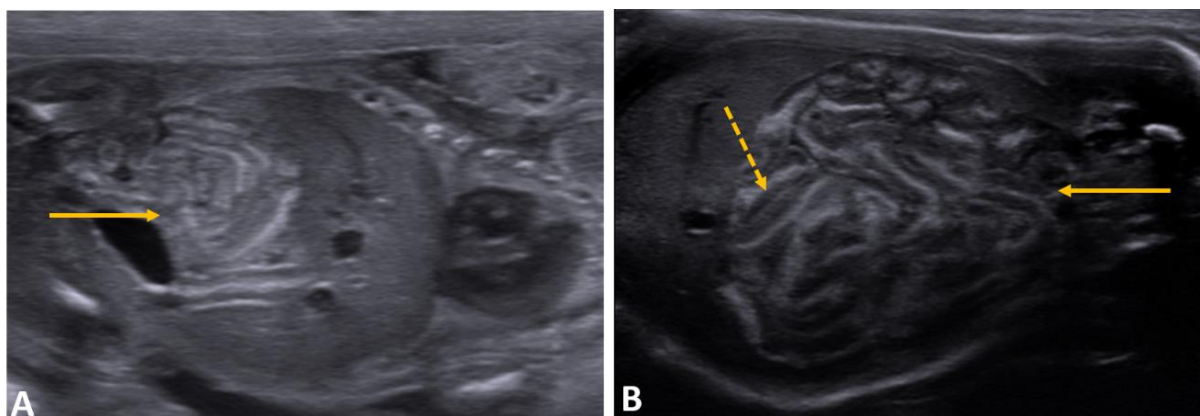


Figura 8: Imagens mostrando o desenvolvimento intestinal (A) Segmentos intestinais ao 47º dia (seta) apresentando melhor definição das camadas e peristaltismo focal; (B) Alças intestinais (seta) com peristaltismo generalizado e estratificação bem definida da parede do intestino (seta pontilhada) com 53 dias de gestação.

Ao 27º dia detectou-se estrutura hepática hiperecoica e com 30º dia apresentou-se isoecoicos em relação ao pulmão, sendo estes órgãos separados por uma linha hipoecoica, referente ao diafragma. Ao 34º dia o fígado era hipoecoico com relação ao parênquima pulmonar, sendo esta diferença progressiva à medida que ocorreu o desenvolvimento. A vesícula biliar com conteúdo anecoico apresentando parede fina e hiperecoica, diferenciada dos vasos hepáticos anecoicos, foi visualizada ao 36º dia. Os lobos hepáticos apareceram formados ao 43º dia. O pulmão foi identificado com 29 dias e se tornou hiperecoico com a evolução da gestação, sendo que ao 35º dia notou-se a traqueia, como estrutura tubular anecoica de parede hiperecoica estendendo-se até a bifurcação entre os brônquios (carina) (Figura 9 e 10).

O baço inicialmente foi observado isoecoico ao fígado ao 35º dia e com 43 dias foi possível diferenciar a ecogenicidade entre parênquima esplênico e hepático, tornando-se hiperecoico em relação ao fígado (Figura 10). Ao 39º dia as adrenais foram identificadas no aspecto medial dos rins, como estruturas alongadas e hipoecoicas. A adrenal direita foi mais difícil de identificar, enquanto a esquerda apresentou formato discretamente bilobado e, em alguns fetos, foi possível observar uma linha fina e hiperecoica relacionada com a junção córtico-medular (Figura 10A).

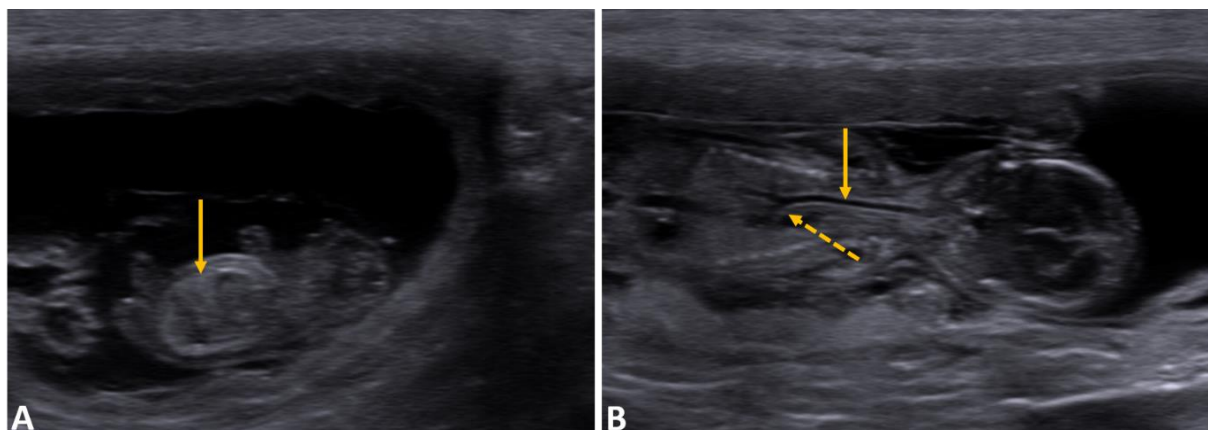


Figura 9: Ultrassonografia HD de embrião e feto caninos. (A) 27 dias de gestação fígado hiperecoico (seta); (B) 36º dia, presença de traqueia (seta) com bifurcação na carina (seta pontilhada), pulmão hiperecoico.

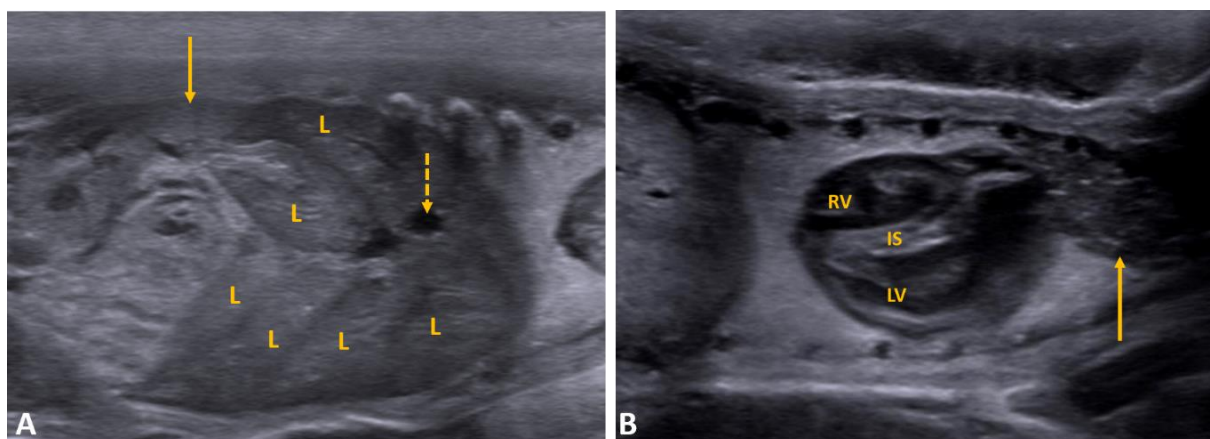


Figura 10: Achados ultrassonográfico de estruturas fetais (A) 47º dia fígado com lobos hepáticos formados e bem definidos (L), vesícula biliar (seta pontilhada) e diferenciação entre fígado e baço (seta); (B) Identificação das câmaras cardíacas: ventrículo direito (RV), ventrículo esquerdo (LV) e septo interventricular (IS), pulmão hiperecoico adjacente ao coração e timo hipoecoico (seta).

Os rins foram visualizados inicialmente a partir do 24º dia, como estruturas hiperecoicas, alongadas, sem pelve e nem definição de córtex e medula. No 36º dia, estas estruturas apresentaram córtex hiperecoica e espessada, presença de pelve dilatada com conteúdo anecoico; na sequência, o córtex e a medula se diferenciaram, o divertículo foi visualizado e a pelve se tornou menos dilatada ao 37º dia. Porém, com

50 dias todos os fetos apresentaram rins com desenvolvimento e imagem semelhante aos de adultos (Figura 11 e 12).

No 31º dia foi evidente área focal anecoica com parede hiperecoica, localizada no abdome caudal condizente com bexiga urinária. Com 40 dias visualizou-se artéria e veia umbilical como duas áreas circulares ao lado da vesícula urinária.

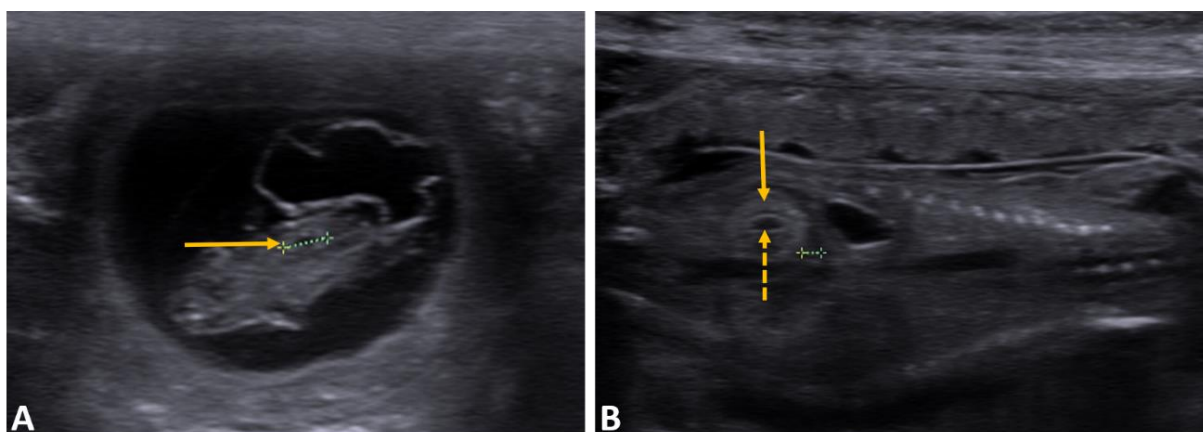


Figura 11: Imagem ultrassonográfica do desenvolvimento renal inicial (A) Estrutura renal primitiva (seta) com 24 dias; (B) Rim direito no 36º dia. Note córtex renal espessado (seta) e pelve renal dilatada (seta pontilhada).

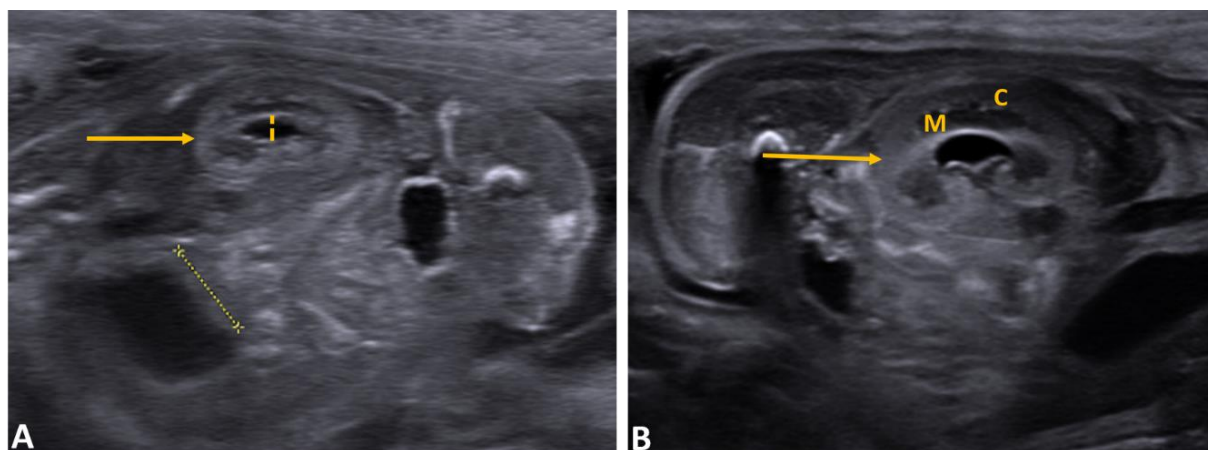


Figura 12: Imagem do desenvolvimento renal (A) Rim esquerdo (seta) no 37º dia com pelve renal menos dilatada (linha pontilhada); (B) Rim direito (seta) com 50 dias de gestação, relação de córtex (C) e medular (M) bem definida.

No primeiro momento da detecção dos batimentos cardíacos foi visualizada uma estrutura sem muita definição correspondente ao coração em estágio primitivo.

O coração inicia-se o desenvolvimento ao 24º dia e ao 30º dia apresenta ecogenicidade hipoeocogênica com septações lineares representando as paredes das câmaras e as valvas. Ao 37º dia foram observadas as quatro câmaras e ao 42º dia os grandes vasos cardíacos. Por sua vez, a aorta abdominal e veia cava caudal foram detectadas ao 34º dias. No 40º dia foi localizado o timo no espaço mediastinal cranial com ecogenicidade hiperecoica, que diminuiu até se tornar hipoecoica ao 44º dia (Figura 10B).

A sexagem fetal foi possível a partir do 39º dia, em corte sagital detectou-se no macho, presença de uma linha medial hiperecoica na região perineal e na fêmea uma protuberância genital caracterizada por linhas hiperecoicas com forma piriforme e uma linha central, que representa os grandes lábios, na região ventral a cauda.

Discussão

Este estudo descreve achados ultrassonográficos HD das fases embrionária e fetal em cadelas braquicefálicas gestantes, fornecendo informações importantes acerca da organogênese e do desenvolvimento gestacional canino, além da detecção precoce e detalhada de estruturas materno-fetais, ainda não descrito na literatura veterinária. Fato justificável pelo progresso tecnológico e aperfeiçoamento dos equipamentos de ultrassom, o que levanta a necessidade de reavaliar o desenvolvimento gestacional não apenas o uso da técnica em caninos, mas também nas diversas espécies animais e atualizar os parâmetros do desenvolvimento embrionário e fetal, anteriormente publicados na literatura veterinária.

Na fase fetal identificaram-se estruturas pela US HD, para nosso conhecimento nunca antes descritas na literatura veterinária, possivelmente pela qualidade da imagem ultrassonográfica sucedido pelo progresso tecnológico e aperfeiçoamento dos equipamentos de ultrassom. A qualidade da imagem decorre da apresentação digital das imagens obtidas, na qual a quantidade de pixels por polegada quadrada é elevada (1080) comparado aos métodos ultrassonográficos tradicionais (aproximadamente 255), isso se correlaciona positivamente com a qualidade e contraste da imagem (PAPIER et al., 2000; RICHARDSON et al., 2001).

O diagnóstico gestacional das fêmeas foi realizado com precocidade (10º ao 13º dia) ao se comparar com a literatura 16º ao 21º dia (ASSIS; SLIMANI, 2008). Este

resultado tem relevante significado para obstetrícia veterinária, pois possibilita confirmação de gestação adiantada para tutores, dá subsídio ao veterinário em casos de gestação indesejável, permite diagnóstico diferencial antecipado de anormalidades ou não associadas ao útero canino e fornece ao obstetra ferramentas para o planejamento dos cuidados gestacionais (FELICIANO et al., 2008; MESQUITA et al., 2009). Esta precocidade observada é justificada pela data de formação da mórula, aproximadamente no 8º dias após a fertilização, e subsequente organização do blastocisto, blastocelo e trofoblasto, processo que correspondem temporariamente à formação da vesícula gestacional (MONTEIRO et al., 2011), estrutura cística facilmente visibilizada ao exame ultrassonográfico.

Aissi e Slimani (2008) descrevem que o embrião canino é visualizado entre o 22º e 23º dia de gestação e Beccaglia (2016) relatou sua detecção no 23º dia após a ovulação. No presente estudo, esta estrutura foi identificada entre o 17º e 18º dia gestacional, antecipando as datas de detecção descritas pelos autores supracitados. Esse momento coincide com o período de implantação embrionária, que se inicia em torno de 18º dia após a ovulação (CHASTANT-MAILLARD et al., 2010).

A frequência cardíaca é detectada, no exame ultrassonográfico convencional, entre o 22º e 24º dia e relaciona-se a um pequeno foco de vibração rápida dentro do embrião, correspondente a uma frequência duas vezes mais que da mãe (AISSI; SLIMANI, 2008; MATTOON; NYLAND, 2015). Nossos resultados corroboram tais afirmações, contudo por meio da ultrassonografia HD foi possível verificar uma movimentação cardíaca precoce ao 18º dia com frequência inicial de 121 e 139 movimentos/minuto, e seu aumento gradativo até normalizar quatro dias posteriores.

Em embriões humanos o sistema cardiovascular é o primeiro a funcionar e inicialmente possui uma motilidade ondulatória de tipo peristáltica, que leva uma movimentação inicial diminuída similar ao observado no exame HD, e que aumenta gradativamente até a 14ª semana de gestação (SILVA; BAILÃO, 2000). Em fetos caninos, este fenômeno não tinha sido relatado, possivelmente pela escassa literatura sobre embriologia (PIERI et al., 2015) ou pela qualidade do exame ultrassonográfico convencional. A US HD permitiu antecipar em 10 dias a identificação das quatro câmaras cardíacas e grandes vasos cardíacos. Segundo Mattoon e Nyland (2015) as

quatro câmaras cardíacas são visibilizadas por volta dos 40 dias e vários dias mais tarde os grandes vasos cardíacos.

No espaço mediastinal cranial com 40 dias foi notado timo e acompanhado sua alteração de ecogenicidade. A avaliação do timo fetal é pouco descrita em todas as espécies, embora estudos recentes sugiram a importância de introduzir a avaliação deste órgão no pré-natal humano, visto que possui correlação com o crescimento e peso corporal (DIEMERT et al., 2016).

O cordão umbilical foi visibilizado antecipadamente (21º dia gestacional) com relação às assertivas realizadas por outros autores, que citam ao 28º dia após pico de LH como o momento de detecção (CONCANNON, 2000). Nossos resultados obtidos conferem com estudo *in vivo*, onde com tal data o embrião já apresenta cordão umbilical (PIERI et al., 2015).

Pela US HD foi possível fornecer informações ultrassonográficas de placa neural, tubo neural primitivo, desenvolvimento do saco vitelínico e alantoide que corroboram com o período da organogênese fetal, onde com 21º e 22º dias o embrião apresenta tais estruturas (PIERI et al., 2015). Dados precoces comparados aos resultados observados pelo método modo B que permite identificar tais estruturas ao 37º dia (FELICIANO et al., 2007).

Na 5ª semana gestacional (35º dia) a massa cerebral é identificada ao modo B em pequena quantidade e apresenta um aumento gradativo com o decorrer das semanas gestacionais nas cadelas (FELICIANO et al., 2013). Utilizando a US HD, a visibilização deste achado foi antecipada (27º dia), momento em que as vesículas cerebrais (prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo) já estão formadas (PIERI et al., 2015). Além disso, a técnica permitiu descrever melhor o tecido e sua formação, com descrição ultrassonográfica da normalidade obtida a imagem da massa cerebral, em formato de “borboleta”, semelhante ao descrito em fetos humanos normais (CAMPO E HWANG, 2018). Tais achados são de valiosa aplicabilidade para diagnosticar anormalidades cerebrais em humanos (MILANI et al., 2015; HARIGOVIND et al., 2019) e poderá servir para avaliação dos fetos caninos.

A avaliação da bula timpânica foi factível por meio da US HD e essas descrições corroboram com o único relato em fetos humanos (LEIBOVITZ et al., 2013), sendo

que estes achados podem auxiliar no diagnóstico pré-natal da perda de audição em humanos.

O botão dos membros é visualizado por volta do 27º ao 31º dia e o esqueleto axial 29º ao 33º (BECCAGLIA et al, 2016), dados estes semelhantes aos achados com a US HD. Contudo, Teixeira et al. (2009) descrevem que o fêmur e úmero em cães podem ser distinguidos no ultrassom a partir do 42º dia de gestação. Foi possível verificar em nossos resultados precocidade na diferenciação destes ossos e a detecção adequada de outros ossos que ainda não tinham sido descritos na avaliação ultrassonográfica até o momento como: escápula, rádio e tíbia; tecidos que são de importância, por exemplo para a avaliação do crescimento fetal em humanos (ARDUINI; GIACOMELLO, 2009).

O osso nasal e região de palato dos fetos caninos foram descritas com originalidade nesse trabalho com 35 dias de gestação. Em humanos a ausência do osso nasal e seu tamanho se associam com a síndrome de Down (MAZZONI et al., 2006) e a visualização do palato é indispensável para reconhecer fenda palatina *in-útero* (VACCARI-MAZZETTI et al., 2009).

Com 27 dias identificaram-se os olhos e 30 dias os cristalinos, datas que antecipam as descrições ultrassonográfica em cães, na qual a literatura relata que os olhos podem ser observados após 39 dias do pico de LH (LAMM; MAKLOSKI, 2012).

Ao 27º dia foi observado o estômago repleto de conteúdo anecoico assim como relatado por Beccaglia et al. (2016), contudo esse trabalho é único quando mencionado sobre o desenvolvimento do estômago e estratificação de parede em fetos caninos. O pâncreas e o esôfago fetal em cães nunca haviam sido avaliados por meio da ultrassonografia. Sabe-se da literatura humana que o pâncreas fetal possui papel vital no crescimento e desenvolvimento do feto e por esse motivo é valioso identificar e avaliar tal órgão (HILL et al., 1989; DESDICIOGLU et al., 2010). Por sua vez a avaliação do esôfago de fetos humanos é útil no diagnóstico de anomalias congênitas (COOPER et al., 1985; MALINGER et al., 2004).

A identificação das alças intestinais, ocorreu em datas semelhantes ao relatado por Gil et al. (2014a). Entretanto esse achado não pode ser usado como preditor da idade gestacional, visto que tais autores citam motilidade generalizada a partir de 57 dias de gestação, diferente do presente estudo que foi verificada a partir de 53 dias,

Essa precocidade comprova que o peristaltismo intestinal não pode ser usado como indicador da conclusão da organogênese fetal (ZONE et al., 2001; GIL et al., 2014a).

O pulmão e o fígado são relativamente isoecoicos quando visibilizados pela primeira vez e a definição clara entre ambos é possível apenas após os 35 dias, segundo Aissi e Slimani (2008). No presente estudo notamos esse mesmo resultado, mas com 30 dias e com 27 identificamos fígado hiperecoico. Estes achados coincidem com a organogênese pois com 23 e 25 dias o embrião possui estrutura hepática e pulmão primitivo respectivamente (CONCANNON et al., 2001; PIERI et al., 2015). A avaliação ultrassonográfica da traqueia em fetos é desconhecida na medicina veterinária, em fetos humanos a análise traqueal é vantajosa no diagnóstico de anomalias congênitas, principalmente da região do pescoço (COOPER et al., 1985; MALINGER et al., 2004).

Com o desenvolvimento gestacional o fígado apresenta aumento de tamanho, os vasos e a vesícula biliar são identificados a partir do 50º dia de gestação em cães segundo Maldonado et al. (2012) e Feliciano et al. (2015), com a HD esses achados foram realizados 14 dias antes. Em humanos a avaliação da vesícula biliar embrionária é importante pois permite diagnosticar anormalidades congênitas como atresia biliar, cálculos e cistos (YAYLA; BAYIK, 2016). Para nosso conhecimento esta é a primeira descrição dos lobos hepáticos e da diferença de ecogenicidade entre fígado e baço em fetos caninos, sendo um resultado similar ao descritos nos animais adultos (HELCK, 2015).

A literatura veterinária não relata a detecção ultrassonográfica do baço fetal como mencionado nesse trabalho, tal avaliação é importante em fetos humanos, sendo que alterações esplênicas fetais como tamanho, ecogenicidade e malformações estão associadas a doenças hematológicas, infecciosas e síndromes do desenvolvimento (DIEMERT; TUTSCHEK, 2018).

Anormalidades estruturais em adrenais de fetos humanos podem ser visualizadas no ultrassom e normalmente estão associadas ao nascimento de fetos prematuros (HAN; COPEL, 2018), mulheres com parto prematuro apresentam fetos com adrenais maiores que fetos normais (TURAN et al., 2011). Dessa forma a descrição inédita, desse estudo para medicina veterinária pode fornecer informações valiosas sobre anormalidades da gestação canina.

Os rins são visibilizados no modo B a partir do 38º dia gestacional (ENGLE et al., 2003; FELICIANO et al., 2014; NYLAND; MATTON, 2015; GIL et al., 2018). Entretanto, por meio da técnica utilizada foi possível identificar estrutura renal hiperecoica com 24 dias, observação correspondente ao desenvolvimento do tecido renal primitivo ou mesonefro (GIER; MARION, 1970; PIERI et al., 2015; BECCAGLIA et al., 2016). Gil et al. (2018) descrevem o desenvolvimento renal de fetos caninos por meio da ultrassonografia de alta resolução, relatando que o rim é identificado ao 39º dia sem definição de córtex e medula e ao 43º com definição de córtex e medula. Nosso trabalho comprova que a US HD possui qualidade de imagem superior quando comparada a de alta resolução sendo que identificamos definição de córtex e medula renal com 37 dias de gestação. A bexiga urinária também foi detectada com precocidade quando comparado a literatura, onde é citada a visualização após 33 dias da cruzada das cadelas (AISSI; SLIMANI, 2008).

A sexagem fetal é descrita em cães a partir da 8ª semana gestacional (Gil et al., 2015), no entanto com a ultrassonografia HD foi possível realizar esta manobra na 6ª semana de gestação.

Conclusão

Conclui-se que a ultrassonografia HD permite identificar precocemente estruturas relacionadas ao processo gestacional em caninos braquicefálicos, estudar o desenvolvimento de sistemas orgânicos embrionários e fetais, além de trazer informações ainda não descritas na literatura veterinária. Tornando esta ferramenta promissora e aplicável a ciência embriológica e a rotina médica veterinária.

Referências

- AISSI, A.; SLIMANI, C. Time of Initial Detection of Fetal Structures e Anatomic Differentiation by Using B-Mode Ultrasound Examination in Bitches. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 13, p. 1750-1753, 2008.
- ARAUJO, J. E.; SANTANA, E. F. M.; NARDOZZA, L. M. M.; MORON, A. F. Avaliação do embrião/feto ao longo da gestação por meio da ultrassonografia tridimensional com o software HD live: ensaio iconográfico. **Radiol Bras [online]**. v.48, n.1, p. 52-55, 2015.
- ARDUINI, D.; GIACOMELLO, F. Fetal biometry, estimation of gestational age, assessment of fetal growth. **Ultrasound in Obstetrics and Gynaecology**. St Louis Elsevier. 1ed, p. 141–155, 2009.
- BECCAGLIA, M.; ALONGE, S.; TROVO, C.; LUVONI, G.C. Determination of gestational time e prediction of parturition in dogs e cats: an update. **Reproduction in Domestic Animals**, v.51, p.12–17, 2016.
- BECCAGLIA, M.; LUVONI, G. C. Prediction of Parturition in Dogs e Cats: Accuracy at Different Gestational Ages. **Reprod Dom Anim**, v. 47, p. 194–196, 2012.
- BONILLA-MUSOLES, F.; RAGA, F.; CASTILLO, J. C.; BONILLA, F. J.; CLIMENT, M. T.; CABALLERO, O. High Definition Real-Time Ultrasound (HDLive) of embryonic e Fetal Malformations before Week. **Journal of Ultrasound in Obstetrics e Gynecology**. v. 7, p. 1-8, 2013.
- CAMPO, D.; HWANG, M. Characterizing the Neonatal Brain With Ultrasound Elastography. **Pediatric Neurology**. V. 86, p. 19-26, 2018.
- CHIN, C. Y.; MAEHARA, A.; FALL, K.; MINTZ, G. R.; ALI, Z. A. Imaging Comparisons of Coregistered Native e Stented Coronary Segments by High-Definition 60-MHz Intravascular Ultrasound e Optical Coherence Tomography. **JACC: Cardiovascular Interventions**, v. 9, n. 12, p. 1305-1306, 2016.

CHASTANT-MAILLARD, S.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; SAINT-DIZIERB, M.; CHODKIEWICZ, M.; REYNAUD, K. Embryo biotechnology in the dog: a review. **Reproduction, Fertility e Development**, v. 22, p. 1049-1056, 2010.

CONCANNON, P. W. Canine pregnancy: predicting parturition e timing events of gestation. In: CONCANNON, P. W.; ENGLE, G.; VERSTEGEN, J.; LINDEFORSBERG, C. (Eds.). Recent advances in small animal reproduction. **International Veterinary Information Service**, Ithaca NY, 2000.

DAVIDSON, A. P.; BAKER, T. W. Reproductive ultrasound of the bitch e queen. **Top Companion Anim Med**, v. 24, n. 2, p. 55-63, 2009.

DIEMERT, A.; TUTSCHEK, B. Fetal Spleen. In: Copel, J. **Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis e Care**. Elsevier, v. 2, p. 151-156, 2018.

ENGLE, G. C. W. Ultrasonographic assessment of abnormal pregnancy. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.28, p.849-868, 1998.

FELICIANO, M. A. R.; GARCIA, P. H. S.; VICENTE, W. R. R. Introdução à Ultrassonografia. In: FELICIANO, M. A.; CANOLA, J. C.; VICENTE, W. R. R. **Diagnóstico por Imagem em Cães e Gatos**. São Paulo: MedVet, v. 1. p. 53 - 57, 2015.

FELICIANO, M. A. R.; CARDILLI, D. J.; NEPOMUCENO, A. C.; CRIVELARO, R. M.; SILVA, M. A. M.; COUTINHO, M. E. F.; VICENTE, W. R. R. Echobiometrics kidney e renal artery triplex doppler of canine fetuses. **Brazilian Journal of Veterinary e Animal Science**, v.66, p.445-449, 2014.

FELICIANO, M. A. R.; NEPOMUCENO, A. C.; CRIVELARO, R. M.; OLIVEIRA, M. E. F.; COUTINHO, L. N.; VICENTE, W. R. R. Fetal echoencephalography e Doppler ultrasonography of the middle cerebral artery in canine fetuses. **Journal of Small Animal Practice**, v. 54, p. 149-152, 2013.

FELICIANO, M. A. R.; VICENTE, W. R. R.; LEITE, C. A. L.; MUZZI, L. A. L. Novas perspectivas no diagnóstico ultra-sonográfico gestacional em cadelas. Revisão de literatura. **Clínica Veterinária**, v. 13, p. 56-60, 2008.

FELICIANO, M. A. R.; MAZZU, L. A. L.; LEITE, C. A. L.; JUNQUEIRA, L. A. Ultra-sonografia bidimensional convencional, de alta resolução e tridimensional no acompanhamento da gestação em cadela. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.5, p.1333-1337, 2007.

GARCIA, A.; NEARY, M. K.; KELLY, G. R.; PIERSON, R. A. Accuracy of ultrasonography in early pregnancy diagnosis in the ewe. **Theriogenology**, v. 39, p. 681-686, 2015.

GIER, H. T., E MARION, G. B. Development of the mammalian testis. In: JONHSON, A. D.; VAN DEMARK, N. L.; GOMES, N. R. **The Testis**. New York: Academic Press. v. 1, p. 1-45, 1970.

GIL, E. M. U.; GARCIA, D. A. A.; GIANNICO, A. T.; FROES, T. R. Early results on canine fetal kidney development: Ultrasonographic evaluation e value in prediction of delivery time. **Theriogenology**, v. 107, p. 180-187, 2018.

GIL, E. M. U.; GARCIA, D. A. A.; FROES, T. R. In utero development of the fetal intestine: Sonographic evaluation e correlation with gestational age e fetal maturity in dogs. **Theriogenology**, v. 82, n. 7, p. 933-941, 2014a.

GIL, E. M. U.; GARCIA, D. A.; GIANNICO, A. T.; FROES, T. R. Canine fetal heart rate: Do accelerations or decelerations predict the parturition day in bitches? **Theriogenology**, v. 84, n. 7, p. 933-941, 2014b.

HALL, V.; HINRICHS, K.; LAZZARI, G.; BETTS, D. H.; HYTTEL, P. Early embryonic development, assisted reproductive technologies, e pluripotent stem cell biology in domestic mammals. **The Veterinary Journal**. v. 197, n. 2, p. 128-142, 2013.

HARIGOVIND, A. D.; BABU, H.; NAIR, S. V.; SANGRAM, N. Z. Fetus in fetu – a rare developmental anomaly. **Radiology Case Reports**. v.14, n. 3, p. 333-336, 2019.

HATA, T. HD live rendering image at 6 weeks of gestation. **J Med Ultrasonics**. v.40, p.495-6, 2013.

JARRETA, G. B. Ultra-sonografia do aparelho reprodutor feminino. In: CARVALHO, C.F. **Ultra-sonografia em pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. p.181-206.

LAMM, C. G.; MAKLOSKI, C. L. Current advances in gestation e parturition in cats e dogs. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 42, n. 3, p. 445-456, 2012.

LEIBOVITZ, Z.; EGENBURG, S.; BRONSHTEIN, M.; SHAPIRO, I.; TEPPER, R.; MALINGER, G.; OHEL, G. Sonographic imaging of fetal tympanic rings. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 42, p. 536–544, 2013.

LINDAHL, I. L. Detection of pregnancy in sheep by means of ultrasound. **Nature**, v. 212, n. 5, p. 642-643, 1966.

MAZZONI, G. T.; FARIA, M.; CASTRO, M. J. B. B.; CHAVES, A. S.; TEIXEIRA, L. S.; CORREIA-JÚNIOR, M. D.; PETTERSEN, H. Ultrasonographic assessment of fetal nasal bone: normal ranges throughout gestation. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**, v.28, n.3, p. 151-157, 2006.

MEAVA, A.; RAVURI, P. R.; KONATHAN, R. High-resolution ultrasound imaging of cutaneous lesions. **Ultrasonography/ Musculoskeletal Radiology**, v. 23, p. 269-277, 2013.

MILANI, H. J.; ARAUJO, E.; CAVALHEIRO, S.; OLIVEIRA, P. S.; HISABA, W. J.; BARRETO, E. Q. S.; BARBOSA, M. M.; NARDOZZA, L. M.; MORON, A. F. Fetal brain tumors: Prenatal diagnosis by ultrasound and magnetic resonance imaging. **World Journal of Radiology**, v. 28, p. 17-21, 2105.

MIRANDA, S. A.; DOMINGUES, S. F. S. Conceptus ecobiometry e triplex Doppler ultrasonography of uterine e umbilical arteries for assessment of fetal viability in dogs. **Theriogenology**, v. 74, p. 608-617, 2010.

MATTOON, J. S.; NYLAND, T. G. **Small Animal Diagnostic Ultrasound**. 3. ed. St Louis: Elsevier, 2015.

MONTEIRO, C. L. B.; MADEIRA, V. L. H.; SILVA, L. D. M. Diagnóstico da gestação em gatas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n.4, p.385-392, 2011.

ONDECK, C. L.; PRETORIUS, D.; MCCAULLEY, J.; KINORI, M.; MALONEY, T.; HULL, A.; ROBBINS, S. L. Ultrasonographic prenatal imaging of fetal ocular e orbital abnormalities. **Survey of Ophthalmology**, v. 63, p. 745 - 753, 2018.

PAPIER, A.; PERES, M.R.; BOBROW, M.; BHATIA, A. The digital imaging system e dermatology. **Int J Dermatol**. v. 39, p.561-75. 2, 2000.

PIERI, N. C. G.; SOUZA, A. F.; CASALS, J. B.; ROBALLO, K. C. S.; AMBROSIO, C. E.; MARTINS, D. S. Comparative Development of Embryonic Age by Organogenesis in Domestic Dogs e Cats. **Reprod Dom Anim**. v. 50, p. 625–631, 2015.

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

RAVICHERA, G.; ARJUN, S.; AJMAL, S.; MANJUNATH, S.; AYSHATH, S. High resolution ultrasonography in dermatology; a psoriasis experience. **Indian Journal of Basic e Applied Medical Research**, v.5, n.2, p. 121-125, 2016.

SILVA, C. L.; BAILÃO, L. A. Assessment of Embryo Heart Rate in Early Pregnancy by Transvaginal Ultrasonography with Color e Pulsed Doppler. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 22, n.9, p. 551-555, 2000.

SONG, L.; MINTZA, G. S.; KADOHIRAA, T.; FALLB, K. N.; BROGNOB, D. A.; MAEHARA, A. Spontaneous coronary artery dissection with intra-adventitial hematoma detected by high-definition intravascular ultrasound. **Coronary Artery Disease**, v. 27, p. 707-708, 2016.

TENKUMO, C.; TANAKA, H.; ITO, T. UKETA, E.; MORI, N.; HANAOKA, U.; KANENISHI, K.; EO, M.; HATA, T. Three-dimensional HDlive rendering images of the TRAP sequence in the first trimester: reverse end-diastolic umbilical artery velocity in a pump twin with an adverse pregnancy outcome. **J Med Ultrasonics**. v.40, p.293-296., 2013.

VACCARI-MAZZETTI, M.P.; KOBATA, C.T.; BROCK, R. S. Antenatal ultrasonography diagnosis of cleft lip and palate. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v, 38, n. 1, p. 130-132, 2009.

ZAMBELLI, D.; PRATI, F. Ultrasonography for pregnancy diagnosis e evaluation in queens. **Theriogenology**, v.66, p.135–144, 2006.

CAPÍTULO 3 – Ecobiometria gestacional em cadelas braquicefálicas utilizando a ultrassonografia de alta definição (US HD)

Abstract

The purpose of this study was to perform the high resolution (HD) ultrasonography study in addition to the formation of some organs that have never been described in the literature. Twelve healthy females, weighing 7-13 kg and aged 1-4 years, of brachycephalic races were used. Conventional ultrasound and HD ultrasonography of the fetuses were performed daily after eight days of artificial insemination until parturition using the ACUSON S2000/SIEMENS ultrasound apparatus and specific softwares. Measurements were made of embryonic and fetal structures, embryonic vesicle diameter, embryo length, biparietal diameter; abdomina; renal length and renal height; femur length; humerus, scapula, radius and tibia; thickening of the stomach wall; adrenal length; cardiac measurements. The significant results ($P < 0.001$), obtained for lateral diameter of the gestational vesicle ($r^2 = 81.8\%$), embryo length ($r^2 = 85.7\%$), biparietal diameter ($r^2 = 99.1\%$), area ($r^2 = 97.2\%$), gastric wall thickness ($r^2 = 86.9\%$), femoral length ($r^2 = 96.6\%$), radius length ($r^2 = 97.5\%$), humeral ($r^2 = 96.5\%$), length of the scapula ($r^2 = 95.8\%$), length of the tibia ($r^2 = 97.3\%$), length ($r^2 = 95.8\%$) and height ($r^2 = 96.0$ ($r^2 = 93.0\%$) and height ($r^2 = 91.5\%$) of the heart of the canine fetuses showed a significant correlation with the gestational days and allowed the estimation of gestational age with variable accuracy and in different periods.

Keywords: canine, pregnancy, ecobiometry, fetal development.

Resumo

O objetivo deste estudo foi obter valores ecobiométricos dos principais tecidos materno-fetais, por meio da ultrassonografia HD. Foram utilizadas 12 fêmeas, híginas, com peso de 7 a 13 kg e idade 1 a 4 anos, de raças braquicefálicas. Realizou-se exames ultrassonográfico convencional e ultrassonografia HD dos fetos, diariamente após oito dias da inseminação artificial até a data de parição, utilizando do aparelho ultrassonográfico ACUSON S2000/SIEMENS e softwares específicos. Foi realizado medidas de estruturas embrionárias e fetais, diâmetro da vesícula embrionária, comprimento do embrião, diâmetro biparietal e abdominal comprimento e altura renal;

comprimento do fêmur; úmero, escápula, rádio e tíbia; espessamento da parede estomacal; comprimento da adrenal; mensurações cardíacas. Os resultados significativos ($P < 0.001$), obtidos para a diâmetro lateral da vesícula gestacional ($r^2 = 81,8\%$), comprimento do embrião ($r^2 = 85,7\%$), diâmetro biparietal ($r^2 = 99,1\%$) e abdominal ($r^2 = 97,2\%$), espessura da parede gástrica ($r^2 = 86,9\%$), comprimento do fêmur ($r^2 = 96,6\%$), comprimento do rádio ($r^2 = 97,5\%$), comprimento do úmero ($r^2 = 96,5\%$), comprimento da escápula ($r^2 = 95,8\%$), comprimento da tíbia ($r^2 = 97,3\%$), comprimento ($r^2 = 95,8\%$) e altura ($r^2 = 96,0\%$) do rim, comprimento da adrenal ($r^2 = 89,6\%$), comprimento ($r^2 = 93,0\%$) e altura ($r^2 = 91,5\%$) do coração dos fetos caninos mostraram correlação significativa com os dias gestacionais e permitem acompanhamento do crescimento fetal, estimativa da idade gestacional com acurácia variável e em diferentes períodos

Palavras Chaves: canino, prenhez, ultrassom, ecobiometria

Introdução

O exame ultrassonográfico gestacional tem uma grande utilidade na rotina veterinária de pequenos animais, pois é o meio de diagnóstico mais preciso na avaliação da gestação e considerado inócuo para o binômio materno-fetal (NEPOMUCENO et al., 2013). Por meio desta técnica é possível acompanhar o desenvolvimento dos órgãos, determinar a viabilidade e estimar a idade gestacional pela ecobiometria das estruturas maternas, embrionárias e fetais (LOPATE, 2008).

A ecobiometria é uma técnica importante para analisar estruturas gestacionais, realizar avaliação morfométrica dos fetos ao longo do desenvolvimento, prever idade gestacional e data provável de parto (MIRANDA; DOMINGUES, 2010). Essa técnica proporciona avaliação da evolução do crescimento fetal no decorrer da gestação e é importante para a redução da mortalidade no período fetal e pré-natal (JOHNSEN et al., 2008).

Em obstetrícia humana, novas técnicas ultrassonográficas têm sido propostas com o intuito de aumentar a acurácia do acompanhamento gestacional, dentre esses métodos a ultrassonografia de alta definição (HD, high definition) obtém destaque, por possuir qualidade de imagem eminente (BONILLA- MUSOLES, 2013; NAWAPUN et al., 2018).

Devido a importância da ecobiometria na avaliação ultrassonográfica, a notável utilidade da técnica ultrassonográfica HD em mulheres gestantes e pelo fato do ineditismo do método em medicina veterinária, considera-se que a técnica possibilitará detectar com precocidade as estruturas materno-fetais e realizar precisa ecobiometria de fetos caninos, fornecendo novos parâmetros de idade gestacional. Com estes preceitos, este estudo objetivou avaliar a eficiência do exame ultrassonográfico HD para prever a idade gestacional em cadelas braquicefálicas mediante a determinação de parâmetros ecobiométricos e acompanhamento do desenvolvimento de tecidos materno-fetais.

Material e Métodos

Aspectos éticos e animais

Este estudo foi realizado com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP/Jaboticabal (n.3652/17). Doze fêmeas das raças Buldogue francês (n= 8), Pug (n = 2) e Shih-tzu (n = 2), com peso entre 7 e 13 kg, idade entre 1 e 4 anos e consideradas saudáveis pela ausência de sinais ao exame físico, hemograma, perfil bioquímico e exame ultrassonográfico do trato reprodutor, foram selecionadas para esse estudo. As fêmeas eram provenientes de canis da região com os quais o departamento mantém parceria e após consentimento livre e esclarecido por parte dos tutores para a participação dos seus animais no estudo.

Oito dias após a inseminação artificial, as fêmeas foram alojadas em canis individuais, com camas apropriadas para gestantes, ventilação, luz e temperatura controlada e alimentadas até o parto com ração comercial para gestantes e água *ad libitum*.

Avaliação do ciclo reprodutivo

Para auxiliar na escolha do melhor momento de inseminação artificial, os responsáveis pelo canil foram treinados para detectar os primeiros sinais de proestro. A fase do ciclo estral foi confirmada pelos sinais de cio (aceitação da copulação pela fêmea) e pela citologia vaginal (SOCHA et al., 2012; FELICIANO et al., 2013). Após

esta confirmação, realizava-se a inseminação artificial com sêmen de machos selecionados e considerados aptos à reprodução após exame clínico e urológico.

Ultrassonografia de alta definição e ecobiometria

A ultrassonografia foi realizada com o aparelho ACUSON S2000® (Siemens, Munique, Alemanha) e um transdutor digital de alta resolução (18L6HD) com frequência padronizada em 17,0 MHz. O ganho, foco e outros ajustes foram feitos durante o exame para obter a melhor imagem para cada feto avaliado. As cadelas passaram por condicionamento de 15 dias antes da inseminação, realizando-se diariamente uma simulação do exame ultrassonográfico, todas as fêmeas foram preparadas com tricotomia antes do exame. Transcorridos oito dias da inseminação, os animais eram conduzidos ao laboratório de ultrassom, posicionados em decúbito dorsolateral esquerdo e aplicado gel de ultrassom para otimizar a aquisição das imagens. Os exames ultrassonográficos foram realizados por um avaliador experiente.

A data da inseminação artificial foi considerada o dia zero e o tempo gestacional confirmado retrospectivamente pela data de parição considerando um período normal de 57 a 63 dias, devido aos períodos variáveis de proestro e estro em cães (CONCANNON et al., 1983). Durante a avaliação ultrassonográfica a idade gestacional era estimada em dias de gestação, utilizando as recomendações de Yeager et al. (1992) e Mattoon e Nyland (2015) combinado com a avaliação do desenvolvimento intestinal e renal relatado por Gil et al. (2014a) e Gil et al. (2018).

Para avaliação ultrassonográfica seguiu-se o protocolo descrito por Gil et al. (2014b), com o objetivo de avaliar o maior número possível de fetos em cada gestante.

Uma vez identificadas, por meio da US HD, as estruturas embrionárias ou fetais foram realizadas as medições, diariamente, utilizando o software do aparelho: diâmetro externo dorsoventral (DVE) e latero-lateral (LLE) da vesícula embrionária; diâmetro interno dorsoventral (DVI) e latero-lateral (LLI) da vesícula embrionária; comprimento do embrião (CE); diâmetro biparietal (DBP) e abdominal (DA); comprimento do fêmur (FEM); comprimento do úmero (UME); comprimento da escápula (ESC); comprimento do rádio (RAD); comprimento da tíbia (TIB); comprimento (CR) e altura renal (AR); espessura da parede estomacal (EST); comprimento da glândula adrenal (CAD); comprimento (CC) e altura (AC) do coração.

Análise estatística

Foi realizada com auxílio do software R-project® (Foundation for statistical computing, Austria). Inicialmente foi testada a distribuição dos parâmetros (teste de Shapiro) e a homocedasticidade (teste de Barlett). Posteriormente as medidas reais ou transformadas foram correlacionadas com dias de gestação pelo teste de Spearman e quando significativo, foi testado o ajuste dos parâmetros e idade gestacional à modelos de regressão (linear, quadrático e cúbico). O nível de significância foi definido em 5% para todos os testes e os resultados apresentados como a média $\pm$ DP (desvio padrão).

Resultados

O tempo médio de gestação nas 12 cadelas foi de 61 ± 3 dias (mínimo 59 e máximo 63) e 68 fetos foram avaliados, todos nasceram saudáveis, o número médio de filhotes por ninhada de 5 ± 3 filhotes.

A ecobiometria das vesículas gestacionais foi realizada do 10º ao 23º dia de gestação. As estruturas eram identificadas como uma cavidade anecoica arredondada de contornos finos e hiperecoicos, sendo que a cavidade anecoica aumenta de tamanho diariamente até o 23º dia (Figura 1A).

A primeira visibilização da estrutura embrionária ocorreu ao 17 dia gestacional (variando de 17 a 18 dias). As medidas do comprimento embrionário foram realizadas a partir do primeiro dia de detecção até o 30º dia gestacional, com crescimento gradativo, multiplicando de tamanho a cada três dias (Figura 1B). Por sua vez, ao 21º dia gestacional todos os embriões apresentaram batimentos cardíacos, sendo em alguns detectados ao 18º dia gestacional. No primeiro dia da detecção da frequência cardíaca, notou-se uma frequência baixa (mínimo 121 bpm e máximo 139 bpm) e após quatro dias manteve-se entre 200 e 240 bpm.

Ao 25º dia gestacional, iniciou-se a medida do diâmetro biparietal (Figura 1C) e em alguns conceitos já era possível identificar estrutura renal e efetuar as medidas do comprimento renal (Figura 3A). No 30º dia de gestação foi possível medir diâmetro abdominal (Figura 1D) e medir a espessura da parede estomacal (Figura 3B) e o comprimento femoral (Figura 2A). Com 31 dias começaram as medidas de coração e altura renal (Figura 3A e D). A tíbia, rádio e escápula foram identificadas e mensurados a partir do 38º dia (Figura 2 B, C, D e E), nessa idade gestacional também se detectou

as glândulas adrenais, na maioria dos conceitos e era executável o comprimento longitudinal (Figura 3C)

A biometria foi realizada sem quaisquer dificuldades, entretanto dois dias antes do parto há dificuldade de se obter imagens satisfatórias devido ao tamanho da ninhada e dos conceitos. Os resultados do estudo de regressão dos parâmetros de ecobiometria que apresentaram correlação significativa com a idade gestacional estão descritos na Tabela 1. Na Figura 4 está a representação gráfica dos três parâmetros que exibiram os maiores coeficientes de determinação da idade gestacional embrionária e fetal.

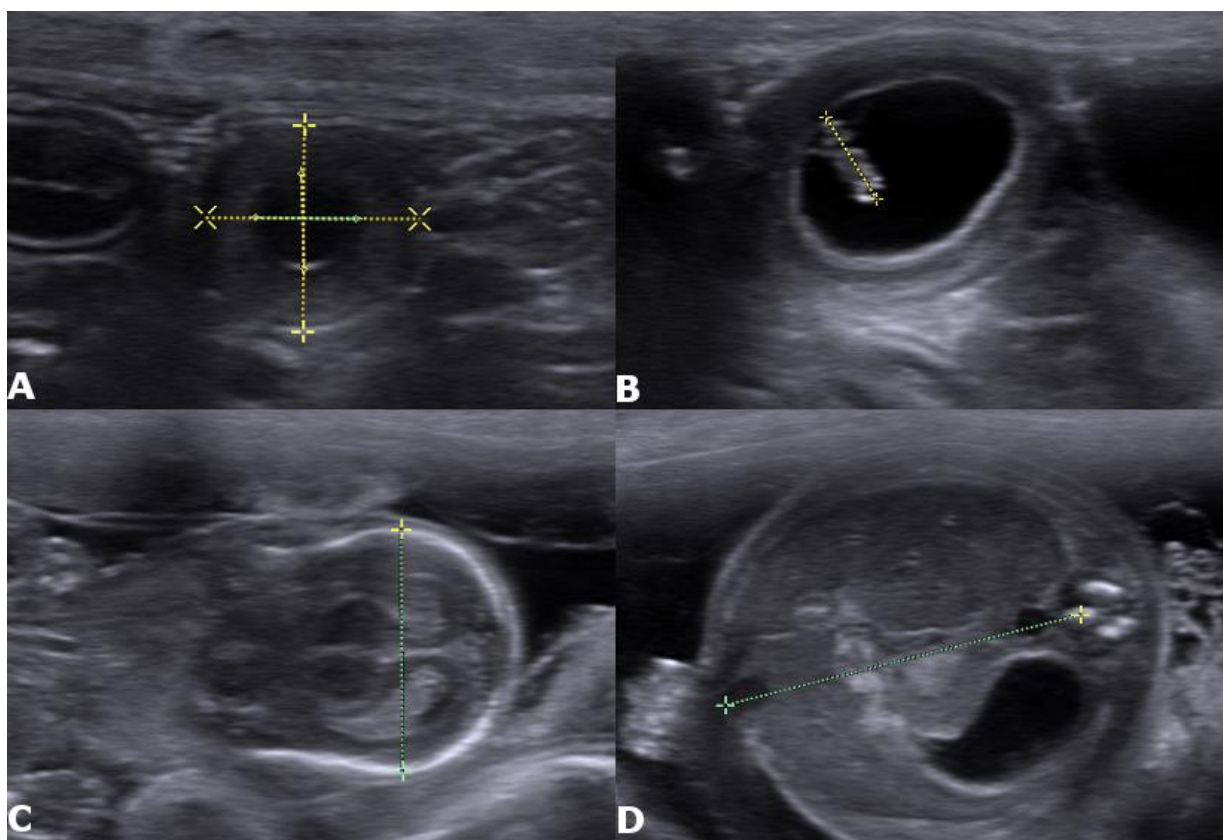


Figura 1. Imagem ultrassonográfica da ecobiometria embrionária e fetal de cães barquicefálicos. (A) ecobiometria da vesícula gestacional; (B) comprimento do embrião; (C) Diâmetro biparietal; (D) Diâmetro abdominal.

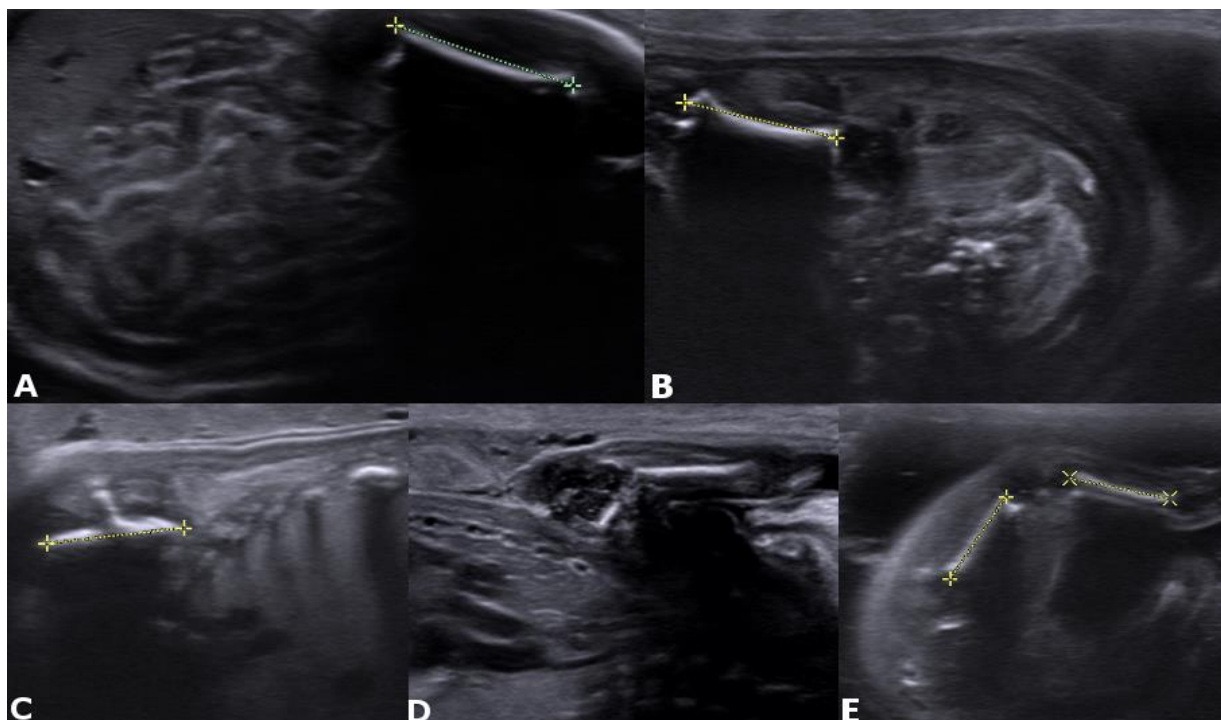


Figura 2. Imagem ultrassonográfica da ecobiometria embrionária e fetal de cães barquicefálicos. (A) comprimento do fêmur; (B) comprimento do úmero; (C) comprimento da escápula; (D) comprimento do rádio; (E) comprimento da tíbia (seta).

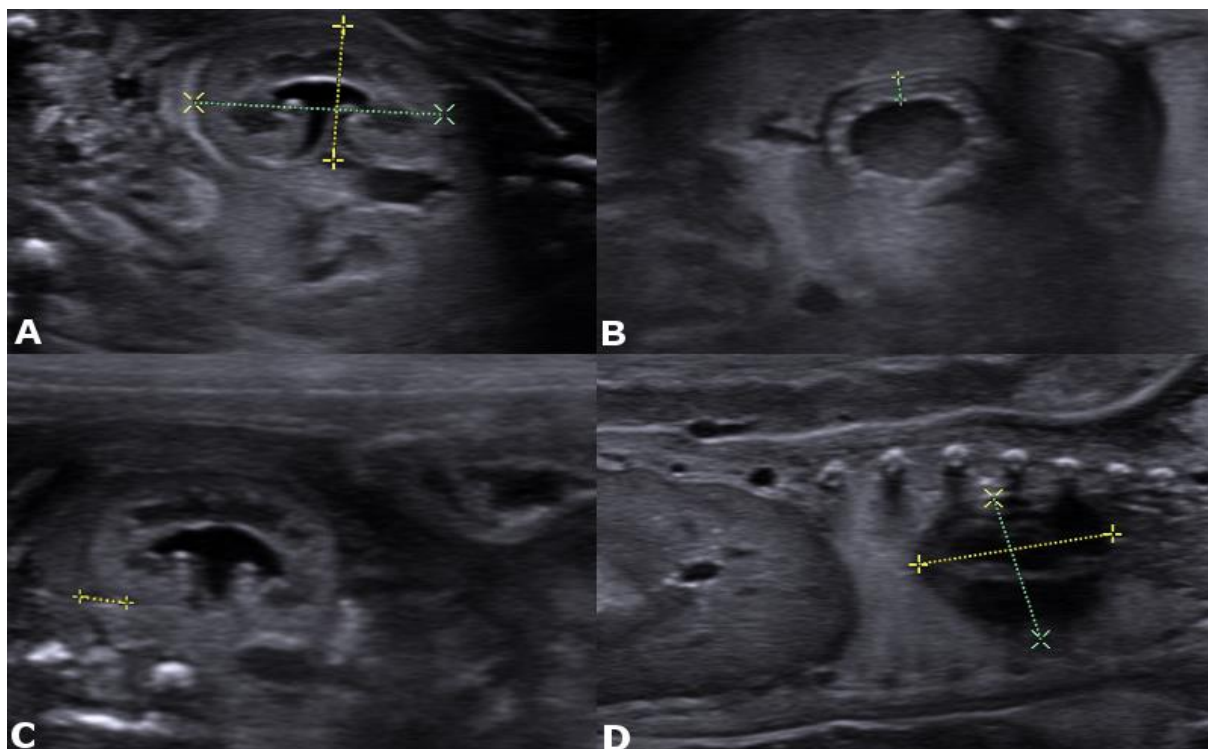


Figura 3. Tecidos avaliados pela ecobiometria. (A) comprimento e altura renal; (B) espessura da parede do estômago; (C) comprimento da adrenal; (D) comprimento e altura do coração.

Tabela 1. Resultados do estudo de regressão dos parâmetros de ecobiometria que apresentaram correlação significativa ($P < 0,05$) com os dias gestacional (DG), fórmulas preditivas e o coeficiente de determinação das mesmas (R^2) em cadelas braquicefálicas, avaliadas diariamente (desde o 8º dia após inseminação artificial até o dia do parto) pela ultrassonografia de alta definição.

Parâmetro	DG	R^2 (%)	Fórmula preditiva
DBP	25 - 63	99,1	$DG = 22,4 + 1,5 \times DBP$
RAD	38 - 63	97,5	$DG = 35,2 + 1,6 \times RAD$
TIB	38 - 63	97,3	$DG = 34,6 + 1,6 \times TIB$
DA	30 - 63	97,2	$DG = 29,8 + 0,75 \times DA$
FEM	30 - 63	96,6	$DG = 33,6 + 1,4 \times FEM$
UME	38 - 63	96,5	$DG = 34,5 + 1,5 \times UME$
AR	31 - 63	96,0	$DG = 33,4 + 2,1 \times AR$
ESC	36 - 63	95,8	$DG = 34,8 + 1,6 \times ESC$
CR	24 - 63	95,8	$DG = 25,5 + 2,6 \times CR - 0,05 \times CR^2$
CC	31 - 63	93,0	$DG = 31,5 + 1,7 \times CC$
AC	31 - 63	91,5	$DG = 32,3 + 1,3 \times AC$
CAD	38 - 63	89,6	$DG = 32,5 + 5,8 \times CAD$
EST	27 - 63	86,9	$DG = 24 + 22,5 \times EST$
CE	17 - 30	85,7	$DG = 19,3 + 0,7 \times CE$
LLE	10 - 23	81,8	$DG = 2,4 + 2,3 \times LLE - 0,07 \times LLE^2$
DVE	10 - 23	79,8	$DG = 3,7 + 2,3 \times DVE - 0,07 \times DVE^2$
LLI	10 - 23	74,9	$DG = 9,8 + 2,7 \times LLI - 0,15 \times LLI^2$
DVI	10 - 23	74,0	$DG = 10 + 3,4 \times DVI - 0,25 \times DVI^2$

DBP: diâmetro biparietal; RAD: comprimento do rádio; TIB: comprimento da tíbia; DA: diâmetro abdominal; FEM: comprimento do fêmur; UME: comprimento do úmero; AR: altura renal; ESC: comprimento da escápula; CR: comprimento renal; CC: comprimento do coração; AC: altura do coração; CAD: comprimento da adrenal; EST: espessamento da parede estomacal; CE: comprimento do embrião; LLE: diâmetro latero-lateral externa da vesícula embrionária; DVE: diâmetro dorsoventral externa da vesícula embrionária; LLI: diâmetro latero-lateral interno da vesícula; DVI: diâmetro dorsoventral interno da vesícula.

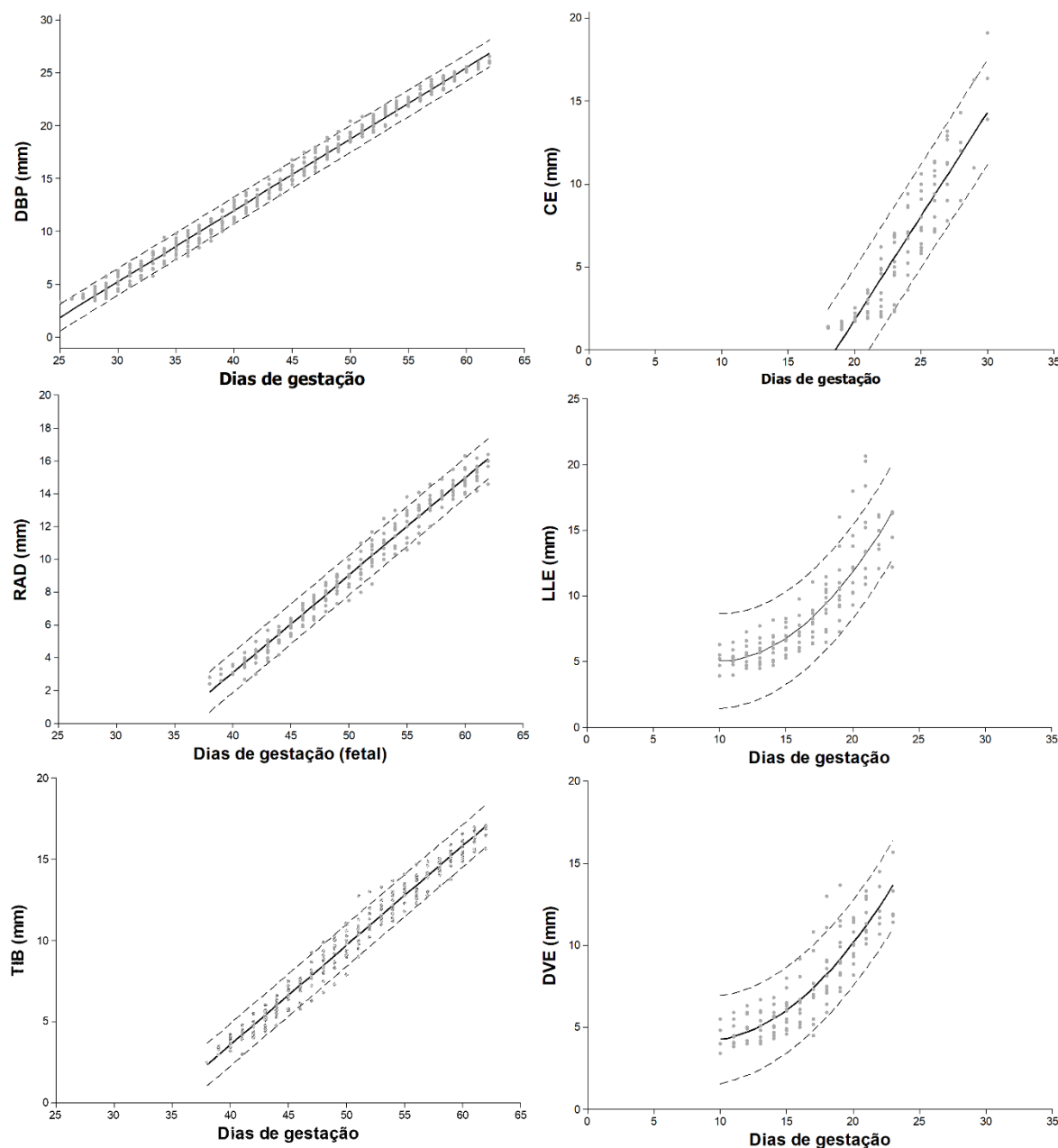


Figura 4. Representação gráfica dos parâmetros ecobiométricos que apresentaram os melhores coeficientes de determinação (R^2) para o cálculo da idade gestacional (dias) embrionária (direita: CE: comprimento do embrião; DVE: diâmetro dorsoventral e LLE: latero-lateral externos da vesícula embrionária) e fetal (esquerda: DBP: diâmetro biparietal; RAD: comprimento do rádio e da TIB: tíbia); em cadelas braquicefálicas, avaliadas diariamente (desde o 8º dia após inseminação artificial até o dia do parto) pela ultrassonografia de alta definição. A linha contínua corresponde ao modelo de regressão adaptado a este parâmetro e as pontilhadas as datas de previsão ao 95% de confiança.

Discussão

Todos os parâmetros ultrassonográficos embrionários e fetais mensurados no presente estudo mostraram correlação significativa com os dias gestacionais e permitem assim uma estimativa da idade gestacional com acurácia variável, além de acompanhamento do crescimento fetal. Este é o primeiro estudo de ecobiometria avaliando diariamente cadelas braquicefálicas, utilizando a ultrassonografia HD como método de imagem, sendo algumas estruturas avaliadas citadas pela primeira vez na literatura veterinária.

A ecobiometria semanal em animais braquicefálicos pode ajudar a avaliação do desenvolvimento dos fetos e auxiliar a obter estimativa da idade gestacional (FELICIANO, 2015). Contudo, a biometria semanal dos fetos caninos apresenta variações que estimam a data antecipada do parto (TEIXEIRA, 2009). Nesse contexto, a ecobiometria diária realizada nesse estudo fornece maior precisão no cálculo da idade gestacional e subsídio para uma adequada avaliação da fêmea e seus conceitos.

A vesícula gestacional começou a ser avaliada no 10º dia gestacional, precocidade essa nunca relatada. Fato esse que pode ser justificado pela embriogênese (MONTEIRO et al., 2011). Dentre esses parâmetros a medida do LLE foi a que apresentou melhor correlação com a idade gestacional ($R^2 = 82\%$) diferente de Feliciano et al. (2013) que obtiveram melhor correlação da idade ($R^2 = 70\%$) avaliando o LLI semanalmente, utilizando a técnica de alta resolução. O diâmetro da vesícula gestacional pode sofrer alterações em gestações anormais, sendo o diagnóstico precoce importante para identificar anormalidades (FREITAS et al., 2016).

O embrião foi mensurado do 17º ao 30º dia gestacional, período que acompanha o momento da implantação até o embrião se tornar um feto (PHEMISTER, 1974). Diferente do observado em nosso estudo, Pretzer (2008) cita que o embrião é visto pela primeira vez ao modo B entre o 22º e 23º dias. Porém, assim como notado neste experimento, estudos baseados na embriologia canina alegam que com 21 dias o embrião possui 4,5mm de comprimento (NODEN; LAHUNTA, 1991; EVANS, 1993; PIER et al., 2015).

Nesse estudo a ecobiometria renal se apresentou como um preditor de idade gestacional discreto, conferindo com fetos humanos, onde o comprimento do rim é

uma medida útil para avaliar anormalidades fetais, mas não é um bom indicador de crescimento (BRENNAN et al., 2018). Esse parâmetro difere de Feliciano et al. (2014), onde os autores citam a ecobiometria renal como adequado preditor de idade gestacional em cadelas.

O diâmetro biparietal foi o melhor preditor da idade gestacional no presente estudo, corroborando com outros estudos (TEIXEIRA et al., 2009; SOCHA et al., 2015; MATTOON; NYLAND, 2015). Adicionalmente, o DBP apresentou o melhor coeficiente de determinação (R^2 99%) e pode ser avaliado a partir do 25º dia gestacional até o momento do parto, diferente do descrito na literatura (MELO et al., 2006; JABIN et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2009; FELICIANO et al., 2015) que indica a utilização deste parâmetro apenas após o 30º dia gestacional.

A biometria das camadas estomacais é cógnita em humanos e ovinos, no qual os valores apresentam correlação linear com a idade gestacional (NAGATA et al., 1994; DAVID et al., 2010), bem como nos presentes resultados. A mensuração da parede gástrica foi realizada, sem qualquer dificuldade, a partir do 27º dia, fato esse não relatado em fetos caninos. Este parâmetro possui grande relevância clínica em humanos no que cerne a terapias genéticas pré-natais para doenças gastrointestinais (ABI-NADER et al., 2009).

O diâmetro abdominal pode ser mensurado a partir da 5ª semana gestacional em cadelas de raça braquicefálica e apresenta aumento linear e boa correlação com a idade gestacional (CAMARGO et al., 2011; FELICIANO et al., 2015). Informação que procede com o presente estudo, contudo o nosso apresentou um coeficiente de determinação (R^2 = 97%) superior ao relatado pelos autores citados.

O comprimento do fêmur fetal em humanos é considerado um excelente preditor da idade gestacional a partir do segundo trimestre gestacional (HADLOCK et al., 1985; FRUSCA, 2018), o presente estudo confere esses resultados uma vez o comprimento do fêmur em cadelas braquicefálicas apresentou um excelente poder preditivo da idade gestacional (R^2 = 97%), valor superior ao verificado por Feliciano et al. (2015) (R^2 = 90%). Evidenciou-se que o comprimento do úmero demonstra melhor correlação com a idade gestacional quando comparada com o fêmur, corroborando com as assertivas de Camargo (2011). Importante destacar os resultados obtidos para ossos como escápula, rádio e tíbia que possuem excelente relação com a idade

gestacional, como em humanos (ARDUINI; GIACOMELLO, 2009). Contudo, dentre todas as ecobiometrias ósseas a melhor predição foi observada ao mensurar o comprimento do rádio (R^2 97,5%), a qual não é muito utilizada em humanos devido a facilidade em se obter o comprimento do fêmur (ARDUINI; GIACOMELLO, 2009).

A biometria da adrenal realizada nesse estudo pode trazer informações valiosas para a medicina veterinária, visto que não há relatos na literatura da identificação e ou medidas da adrenal em fetos caninos, por meio da ultrassonografia. Esse parâmetro apresentou boa correlação com a predição da idade gestacional (R^2 89,6%). Adicionalmente, pode proporcionar estudos futuros acerca de parto prematuro, uma vez que esse parâmetro é um excelente preditor de parto prematuro em mulheres com 87% de especificidade. Mulheres com parto prematuro apresentam fetos com adrenais maiores que fetos normais (TURAN et al., 2011).

Conclusão

Todos as medidas biométricas estudadas pela ultrassonografia de alta definição resultaram preditivas para a idade gestacional em cadelas braquicefálicas; cabe destacar o diâmetro biparietal como o melhor preditor pela sua acurácia e o tempo de abrangência do 25º dia até o momento do parto; o comprimento dos ossos rádio e tíbia também ganham destaque no período compreendido entre o 35º dia e o parto. Por sua vez a medição do diâmetro externo da vesícula embrionária e do comprimento fetal resultaram ser os parâmetros mais adequados para o cálculo da idade gestacional nos embriões de cadelas de raças braquicefálicas. Estes resultados brindam importantes bases para a avaliação obstétrica deste tipo de cadelas e abrem as portas para estudos do desenvolvimento gestacional com a ferramenta de alta definição.

Referências

- ABI-NADER, K.; WHITTEN, S. M.; FILIPPI, E.; SCOTT, R.; JAUNIAUX, E. Dichorionic Triamniotic Triplet Pregnancy Complicated by Acardius Acormus. **Fetal Diagnosis and Therapy**, v. 26, p. 45–49, 2009.
- ARAUJO, J. E.; SANTANA, E. F. M.; NARDOZZA, L. M. M.; MORON, A. F. Avaliação do embrião/feto ao longo da gestação por meio da ultrassonografia tridimensional com o software HD live: ensaio iconográfico. **Radiol Bras [online]**. v.48, n.1, p. 52-55, 2015.
- ARDUINI, D.; GIACOMELLO, F. Fetal biometry, estimation of gestational age, assessment of fetal growth. **European Board & College of Obstetrics and Gynaecology**, v. 9, p. 142-155, 2009.
- BRENNAN, S.; WATSON, D.; RUDD, D.; SCHNEIDER, M.; KANDASAMY, Y. Evaluation of fetal kidney growth using ultrasound: A systematic review. **European Journal of Radiology**, v. 96, p.55-64, 2018.
- BONILLA-MUSOLES, F.; RAGA, F.; CASTILLO, J. C.; BONILLA, F. J.; CLIMENT, M. T.; CABALLERO, O. High Definition Real-Time Ultrasound (HDLive) of embryonic and Fetal Malformations before Week. **Journal of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**. v. 7, p. 1-8, 2013.
- CAMARGO, N. I.; BERLIM, A. T.; MAGALHÃES, F. J. R.; MANSO FILHO, H. C.; WISHRAL, A. Biometria fetal em cadelas da raça Shih-Tzu através de ultrassonografia. **Med Vet**, v. 5, p. 1-6, 2011.
- DAVID, A. L.; ABI-NADER, K. N.; WEISZ, B.; SHAW, S. W. S.; THEMIS, M.; COOK, T.; COUTELLE, C.; RODECK, C. H.; PEEBLES, D. M. Ultrasonographic Development of the Fetal Sheep Stomach and Evaluation of Early Gestation Ultrasound-guided In Utero Intragastric Injection. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.49, n.1, p. 23-29, 2010.

DAVIDSON, A. P.; BAKER, T. W. Reproductive ultrasound of the bitch and queen. **Top Companion Anim Med**, v. 24, n. 2, p. 55-63, 2009.

EVANS, H. E.; CHRISTENSEN, G. C.; Prenatal development. In: EVANS, H. E. **Miller's Anatomy of the Dog**. Philadelphia: WB Saunders, 1993 p. 32–97.

GIL, E. M. U.; GARCIA, D. A. A.; FROES, T. R. In utero development of the fetal intestine: Sonographic evaluation and correlation with gestational age and fetal maturity in dogs. **Theriogenology**, v. 82, n. 7, p. 933-941, 2014.

GIL, E. M. U.; GARCIA, D. A. A.; GIANNICO, A. T.; FROES, T. R. Early results on canine fetal kidney development: Ultrasonographic evaluation and value in prediction of delivery time. **Theriogenology**, v. 107, p. 180-187, 2018.

FELICIANO, M. A. R.; VICENTE, W. R. R.; LEITE, C. A. L.; MUZZI, L. A. L. Novas perspectivas no diagnóstico ultra-sonográfico gestacional em cadelas. Revisão de literatura. **Clínica Veterinária**, v. 13, p. 56-60, 2008.

FELICIANO, M. A. R.; NEPOMUCENO, A. C.; CRIVELARO, R. M.; OLIVEIRA, M. E. F.; COUTINHO, L. N.; VICENTE, W. R. R. Fetal echoencephalography and Doppler ultrasonography of the middle cerebral artery in canine fetuses. **Journal of Small Animal Practice**, v. 54, p. 149-152, 2013.

FELICIANO, M. A. R.; CARDILLI, D. J.; NEPOMUCENO, A. C.; CRIVELARO, R. M.; SILVA, M. A. M.; COUTINHO, M. E. F.; VICENTE, W. R. R. Echobiometrics kidney e renal artery triplex doppler of canine fetuses. **Brazilian Journal of Veterinary e Animal Science**, v.66, p.445-449, 2014.

FELICIANO, M. A. R.; MACIEL, G. S.; COUTINHO, L. N.; ALMEIDA, V. T.; USCATEGUI, R. A. R.; VICENTE, W. R. R. Gestational echo biometry in brachycephalic pregnant bitches. **Ciência Animal Brasileira**, v.16, p.419-427, 2015.

FREITAS, L. A.; MOTA, G. L.; SILVA, H. V. R.; CARVALHO, C. F.; SILVA, L. D. M. Can maternal-fetal hemodynamics influence prenatal development in dogs? **Animal Reproduction Science**, v.172, p.83-93, 2016.

FRUSCA, T.; TODROS, T.; LEES, C.; BILARDO, C. M. Outcome in early-onset fetal growth restriction is best combining computerized fetal heart rate analysis with ductus venosus Doppler: insights from the Trial of Umbilical and Fetal Flow in Europe. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 218, n. 2, p. 783-789, 2018.

HADLOCK, F. P.; HARRIST, R. B.; SHARMAN, R. S.; DETER, R. L.; PARK, S. K. Estimation of fetal weight with the use of head, body, and femur measurements – a prospective study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 151, n. 3, p. 333-7, 1985.

JABIN, V. C. P.; FINARDI, J. C.; MENDES, F. C. C.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E.; MORAES, R. Uso de exames ultra-sonográficos para determinar a data de parturição em cadelas da raça Yorkshire. **Archives of Veterinary Science**, v.12, p. 63-70, 2007.

JOHNSEN, S. L.; WILSGAARD, T.; RASMUSSEN, S.; HANSON, M. A.; GODFREY, K.; KISERUD, T. Fetal size in the second trimester is associated with the duration of pregnancy, small fetuses having longer pregnancies. **Pregnancy and Childbirth**, v. 25, p. 1-7, 2008.

LOPATE, C. Estimation of gestational age and assessment of canine fetal maturation using radiology and ultrasonography: A review. **Theriogenology**, v. 70, p.397–402, 2008.

MELO, K. C. M.; SOUZA, D. M. B.; TEIXEIRA, M. J. C. D. S.; WISCHRAL, A. Fetometria ultra-sonográfica na previsão da data do parto em cadelas das raças Cocker Spaniel Americano e Chow-Chow. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.9, p. 23-30, 2006.

MESQUITA, S. F. P.; NOCOLIELO, M.; BARBIERI, M. F.; MICHİYORI, B. T.; SILVA E. R.; KLEIN M. O.; ROSA J. L.; CAVARIANI M. M.; CAMARGO, I. C. C. Efeitos do

estresse induzido por imobilização na prenhez da rata. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.11, n.3, p. 277-282, 2009.

MIRANDA, S. A.; DOMINGUES, S. F. S. Conceptus ecobiometry and triplex Doppler ultrasonography of uterine and umbilical arteries for assessment of fetal viability in dog. **Theriogenology**, v.74, p. 608–617, 2010.

MONTEIRO, C. L. B.; MADEIRA, V. L. H.; SILVA, L. D. M. Diagnóstico da gestação em gatas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n.4, p.385-392, 2011.

NAGATA, S.; KOYANAGI, T.; FUKUSHIMA, S.; AKAZAWAD, S.; NAKANO, H. Change in the three-dimensional shape of the stomach in the developing human fetus. **Early Human Development**, v. 37, p. 27-38, 1994.

NAWAPUN, K.; PHITHAKWATCHARA, N.; JAINGAM, S.; VIBOONCHART, S.; MONGKOLCHAT, N.; WATAGANARA, T. Advanced ultrasound for prenatal interventions. **Ultrasonography**, v. 37, n.3, p. 200-210, 2018.

NEPOMUCENO, A. C.; GARCIA, D. A. A.; BARROS, F. F. P. C. Ultrassonografia do Sistema Reprodutor Feminino de Pequenos Animais. In: Feliciano, M. A. R.; Oliveira, M. E. F.; Vicente, W. R. R. **Ultrassonografia na Reprodução**. 1. ed. São Paulo: MedVet, 2013.

NODEN, D. M.; DE LAHUNTA, A. The embryology of domestic animals. In: NODEN, D. M.; DE LAHUNTA, A. **Embryology of Domestic Animals: Developmental Mechanisms and Malformations**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1985. p. 104.

TURAN, M. O.; TURAN, S.; FUNAI, F. E.; BUHIMSCHI, I. A.; CAMPBELL, C. H.; BAHTIYAR, O. M.; HARMAN, C. R.; COPEL, J. A.; BUHIMSCHI, C. S.; BASCHAT, A. A. Ultrasound measurement of fetal adrenal gland enlargement: an accurate predictor of preterm birth. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 204, n. 4, p. 311 – 311, 2011.

PIERI, N. C. G.; SOUZA, A. F.; CASALS, J. B.; ROBALLO, K. C. S.; AMBROSIO, C. E.; MARTINS, D. S. Comparative Development of Embryonic Age by Organogenesis

in Domestic Dogs and Cats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 625–631, 2015.

PHEMISTER, R. D. Nonneurogenic reproductive failure in the bitch. **Veterinary Clinics of North America**, v. 4, p. 573–586, 1974.

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

SOCHA, P.; JANOWSKI, T.; BANCERZ-KISIEL, A. Ultrasonographic fetometry formulas of inner chorionic cavity diameter and biparietal diameter for medium-sized dogs can be used in giant breeds. **Theriogenology**, v.84, p. 779 –783, 2015.

TEIXEIRA, M. J.; SOUZA, D. M. B.; MELO, K. C. M.; WISCHRAL, A. Estimation of parturition date through ultrasonographic foetal biometry in rottweiler bitches. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.3, p. 853-861, 2009.

YEAGER, A. E.; MOHAMMED, H. O.; WALLEN, V. M.; VANNERSON, L.; CONCANNON, P. W. Ultrasonographic appearance of the uterus, placenta, fetus, and fetal membranes throughout accurately timed pregnancy in beagles. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 3, p. 342-351, 1992.

CAPÍTULO 4 – Elastografia ARFI e ultrassonografia pulmonar de fetos caninos com hidropsia

Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.70, n.5, p.1409-1413, 2018

Pulmonar ARFI elastography and ultrasonography of canine fetal hydrops: case report

[Elastografia ARFI e ultrassonografia pulmonar de fetos com hidropsia fetal canina: relato de caso]

M.C. Maronezi¹, G.M. Madruga¹, R.A.R. Uscategui¹, A.P.R. Simões¹, P. Silva¹, M.G.K. Rodrigues¹,
C.A. Cintra¹, A.R. Assis², W.R.R. Vicente¹, M.A.R. Feliciano^{1,3*}

Abstract

This case report describes diagnostic e prognostic applicability of pulmonary acoustic radiation force impulse elastography e ultrasonography in canine hydrops fetalis. We also explore these methods' potential in prediction of postnatal respiratory dysfunction. Two pregnant bitches (English bulldog [case 1] e French bulldog [case 2]) were referred for sonographic evaluation in their last week of pregnancy. Ultrasound showed that in each bitch, one fetus presented with lung alterations (hyperechogenicity, irregular surface, e pleural effusion) e anasarca. The other fetuses of the litter were normal, e they were observed as light gray e dark blue on pulmonary elastography. Their shear-wave velocity was 0.75m/s. Fetuses with hydrops were observed as medium gray e dark blue, e the average shear-wave velocities were 1.05m/s (case 1) e 1.12m/s (case 2). Findings were compatible with increased lung rigidity. Six neonates of English bulldog e two of French bulldog showed no signs of clinical abnormalities during neonatal assessment. One puppy in each gestation presented with anasarca e respiratory distress, e died approximately 24 hours after birth. Novel ultrasound techniques (elastography) for assessing pulmonary tissues in abnormal fetuses in veterinary obstetrics can promote early, safe, e non-invasive diagnosis of canine prenatal e neonatal alterations.

Keywords: canine, gestational ultrasonography, fetal abnormalities

Resumo

Este relato de caso descreve a aplicabilidade diagnóstica e prognóstica da elastografia ARFI e ultrassonografia pulmonar em fetos caninos com hidropisia, como um método potencial para prever a disfunção respiratória pós-natal nesses conceitos. Duas cadelas gestantes (Bulldog Inglês - caso 1 e Bulldog Francês - caso 2) foram encaminhadas para avaliação ultrassonográfica na última semana de gestação. Pela ultrassonografia foram observadas, em cada cadela, um feto apresentando alterações pulmonares (hiperecogenicidade, superfície irregular e derrame pleural) e anasarca. Outros fetos não apresentaram anormalidades. Os fetos normais apresentaram elastograma pulmonar cinza-claro e azul-escuro e velocidade de cisalhamento de 0,75m/s. Os fetos com hidropisia apresentaram tonalidades cinza-média e azul-escura e velocidade de cisalhamento de 1,05m/s (caso 1) e 1,12m/s (caso 2). Esses achados são compatíveis com o aumento da rigidez pulmonar. Seis neonatos Bulldog Inglês e dois Bulldogs Franceses não mostraram sinais de anormalidades clínicas na avaliação neonatal. Um filhote de cada gestação apresentou anasarca e dificuldade respiratória, vindo a óbito cerca de 24 horas após o nascimento. O uso das novas técnicas de ultrassonografia (elastografia) para avaliação de tecidos pulmonares em feto anormal, em obstetrícia veterinária, pode promover o diagnóstico precoce, seguro e não invasivo de alterações pré-natais e neonatais em conceitos caninos.

Palavras-chave: canino, ultrassonografia gestacional, anormalidades fetais.

Introdução

A hidropsia fetal em cães é uma anormalidade congênita causada por desequilíbrio hemostático de fluidos no feto, levando ao acúmulo de líquido nos tecidos subcutâneos (anasarca), sistema nervoso central (hidrocefalia), membranas fetais (hydroallantois ou hydramnios) e cavidades (efusões peritoneal, pericárdica e pleural) (Assis *et al.*, 2013; Feliciano *et al.*, 2013).

O derrame pleural secundário a hidropisia fetal está correlacionado com altas taxas de mortalidade perinatal em humanos (Freitas, 2011). Não há relatos na literatura veterinária que descrevem essa correlação; entretanto, sabe-se que a

hidropisia está associada a altas taxas de mortalidade em animais neonatais (Assis *et al.*, 2013).

A elastografia ARFI (acoustic radiation force impulse) é uma técnica de imagem ultrassonográfica utilizada para a avaliação da elasticidade tecidual (Feliciano *et al.*, 2014). Estudos recentes mostraram que esta técnica é aplicável e viável para a avaliação do tecido pulmonar fetal em babuínos (Quarello *et al.*, 2016), humanos (Zheng *et al.*, 2016), cães (Simões, 2016), e ovinos (Silva, 2017). Os parâmetros observados também se correlacionam com o desenvolvimento gestacional dessas espécies. Nos fetos humanos, a ultrassonografia é realizada para avaliar a maturidade e as anomalias dos tecidos pulmonares (Simões, 2016).

Até o momento, nenhum estudo descreveu a aplicabilidade da elastografia ARFI no diagnóstico de alterações pulmonares em fetos caninos. Este relato de caso descreve a aplicabilidade diagnóstica e prognóstica da elastografia ARFI em hidropisia fetal canina. Além de descrever o potencial deste método para prever disfunção respiratória pós-natal.

Descrição do caso

Duas cadelas gestantes, saudáveis e sem sinais de intercorrências clínicas durante a gestação foram encaminhadas para avaliação ultrassonográfica na última semana gestacional afim de avaliar a viabilidade fetal e estimar a idade gestacional: uma primípara de dois anos de idade, 25 kg, da raça Buldogue inglês (caso 1) e uma múltípara de dois anos, 13 kg, raça buldogue francês (caso 2).

Um único ultrassonografista experiente realizou os exames. A ultrassonografia convencional foi realizada com um transdutor linear de 9,0 MHz, utilizando o equipamento de ultrassom ACUSON S2000/SIEMENS (Siemens, Munique, Alemanha) para avaliar a viabilidade gestacional (através do desenvolvimento do tecido fetal), frequência cardíaca e idade gestacional ultrassonográfica. A idade gestacional ultrassonográfica foi estimada utilizando-se a seguinte fórmula: idade gestacional = $[(6 \times \text{diâmetro parietal}] + [3 \times \text{diâmetro abdominal}] + 30$). Uma observação também foi feita para determinar se os achados de imagem eram compatíveis com o período de avaliação (Socha *et al.*, 2012).

Por meio da ultrassonografia modo-B, o examinador estimou a média dos períodos de gestação em 58 dias (caso 1) e 60 dias (caso 2). Pelo menos três fetos foram observados, e a frequência cardíaca média foi de 181 batimentos/min em ambos os casos. Em cada cadela, um feto apresentava hiperecogenicidade pulmonar (em comparação aos demais fetos), superfície pulmonar irregular (retração pulmonar), derrame pleural, espessamento subcutâneo, e um conteúdo anecoico entre a pele e a camada muscular (Figura 1). Esses achados foram compatíveis com hidropsia fetal.

A análise qualitativa e quantitativa das estruturas pulmonares fetais em fetos normais e aqueles com hidropisia foi realizada utilizando o método VTIQ de ARFI (virtual touch tissue imaging quantification, 2D shear-wave elastography technique) (Feliciano et al., 2014; Tang et al., 2015). A elastografia qualitativa ARFI produziu imagens em escala de cinza (elastograma) que foram avaliadas da seguinte forma: tons esbranquiçados (áreas pretas ou azuladas: menos rígidas) corresponderam a tecidos mais elásticos (macios) e tons mais escuros (áreas esbranquiçadas ou avermelhadas: tecidos rígidos não deformáveis) tecidos mais rígidos (duros). A avaliação quantitativa das estruturas pulmonares foi realizada para obter a velocidade de onda de cisalhamento (m/s). Três a seis medições de diferentes áreas desses tecidos foram selecionadas por meio do calíper para determinar a velocidade média da onda de cisalhamento.

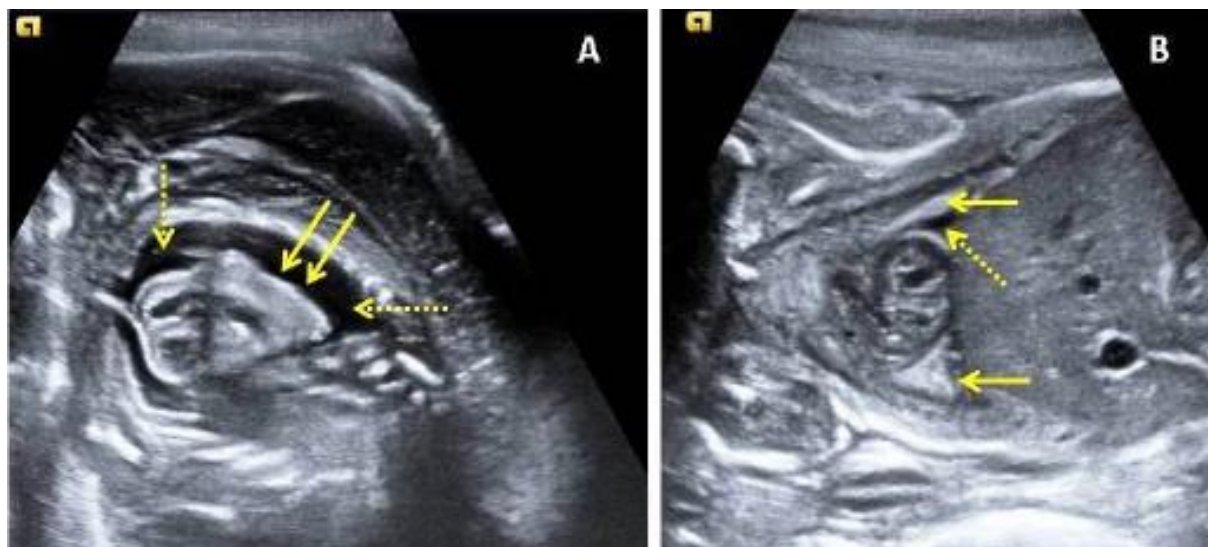


Figura 1. Imagens ultrassonográficas de fetos caninos com hidropsia (A: buldogue inglês e B: buldogue francês). Observe a presença de derrame pleural (setas pontilhadas) e estruturas pulmonares fetais com superfícies irregulares e hiperecogenicidade (setas contínuas).

Fetos normais apresentaram elastograma pulmonar com tonalidades cinza claro e azul escuro e valores médios para velocidade de cisalhamento de 0,75 m/s. Em fetos com hidropsia, o elastograma pulmonar apresentou tonalidade cinza médio e azul escuro e valores médios para velocidade de cisalhamento de 1,05 m/s (caso 1) e 1,12 m/s (caso 2), sendo tais achados compatíveis com aumento da rigidez pulmonar.

Após avaliações ultrassonográficas minuciosas, as gestantes foram submetidos a cesariana. Os pacientes do caso 1 e caso 2, nasceram sete e três filhotes, respectivamente seis bulldogs ingleses e dois filhotes de bulldog francês não apresentaram sinais de anormalidades clínicas durante a avaliação neonatal. No entanto, o caso 1 apresentou um filhote com anasarca e desconforto respiratório, e o caso 2 possuiu um filhote com angústia respiratória. Ambos os filhotes foram estabilizados, mas morreram aproximadamente 24 horas após o nascimento. Não houve consentimento para necropsia.

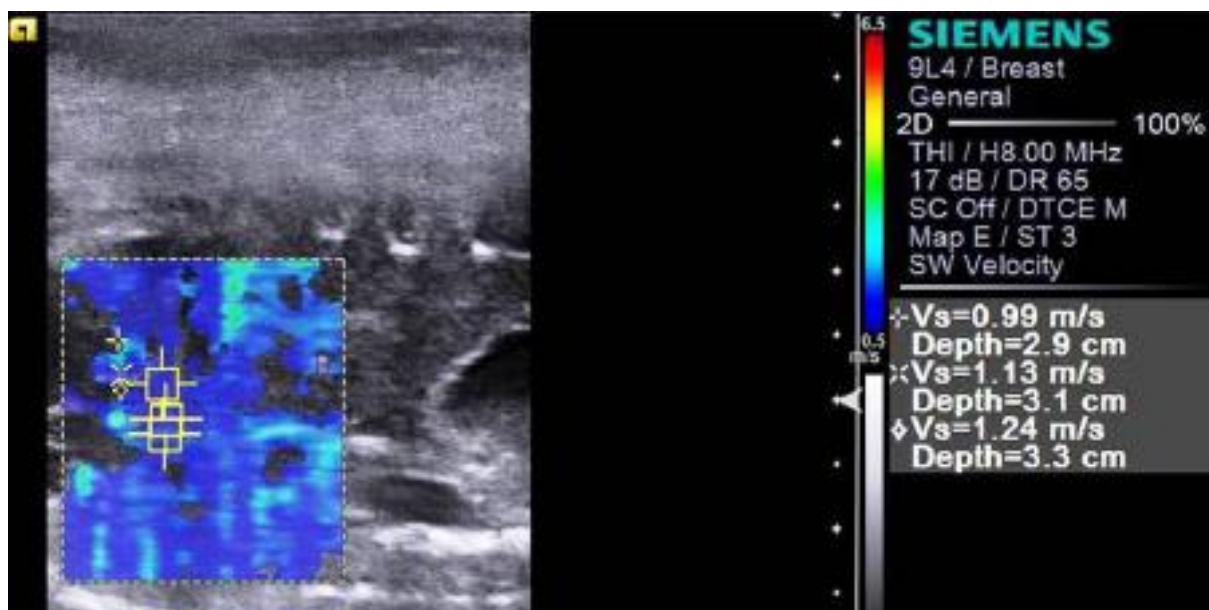


Figura 2. Imagem elastográfica de um feto de buldogue francês com hidropsia. O exame permitiu determinar o tom do tecido pulmonar fetal e a velocidade da onda de cisalhamento do tecido anormal (canto direito).

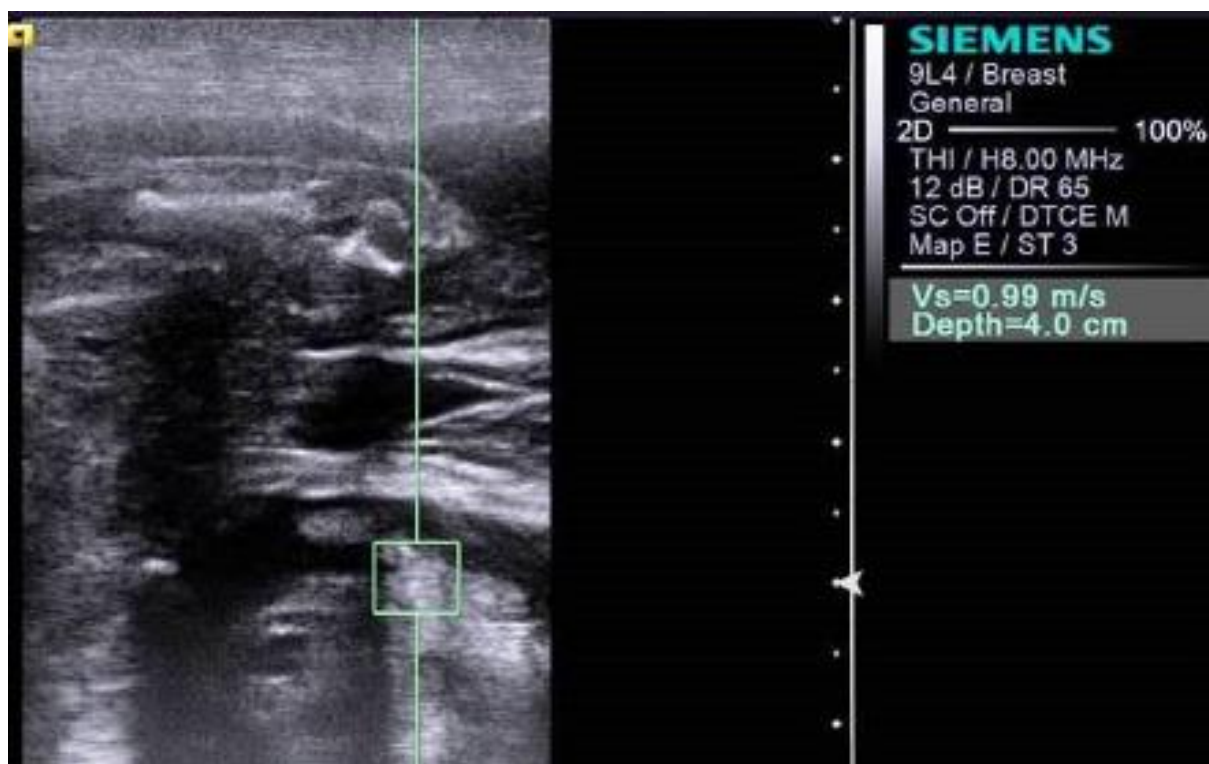


Figura 3. Imagem Elastográfica de um feto de buldogue inglês com hidropsia. O exame permitiu determinar a velocidade da onda de cisalhamento do tecido anormal (canto direito).

Discussão

As hidropsias fetais em caninos tem relevante importância em obstetrícia veterinária, pois assim como no presente relato são considerados indicadores para condução à cesariana devido ao risco de distocia, além de serem responsáveis por elevado índice de mortalidade neonatal nesta espécie e em humanos (Freitas, 2011; Assis *et al.*, 2013). A mortalidade dos neonatos acometidos, especialmente com efusão pleural, está correlacionada com anormalidades na maturidade e desenvolvimento do tecido pulmonar (Illanes *et al.*, 2005). Neste contexto, atribui singular relevância para o diagnóstico precoce de alterações pulmonares fetais por meio de técnicas de imagem, sendo a elastografia ARFI descrita com aplicabilidade inédita neste relato.

A ultrassonografia gestacional é de ampla utilidade na detecção de anormalidades relacionadas com a hidropsia fetal em caninos (Feliciano *et al.*, 2013) e possibilitou a visualização do acúmulo anormal de líquido nos dois conceitos anormais deste relato. Os achados ultrassonográficos relacionados com presença de fluidos em região subcutânea e cavidade torácica observados nos fetos caninos são semelhantes aos descritos por Assis *et al.* (2013) e Sridevi *et al.* (2016).

Alterações na ecogenicidade do tecido pulmonar dos fetos com hidropsia ainda não foram descritos na literatura veterinária. O aumento da ecogenicidade pulmonar e irregularidade da superfície deste órgão visualizada nos fetos anormais podem estar relacionadas à síndrome de angústia respiratória constatada nos dois neonatos que morreram. Segundo Illanes *et al.* (2005), em humanos a associação entre hidropsia fetal e a presença de pulmão ecogênico é comum e se correlaciona com elevada taxa de mortalidade neonatal. O déficit respiratório e anormalidades no tecido pulmonar são decorrentes de lesões promovidas pela aumento da pressão intratorácica nos indivíduos acometidos causada pelo acúmulo de líquido pleural (Illanes *et al.*, 2005; Yinon *et al.*, 2008; Freitas, 2011).

O estudo realizado por Silva (2017), demonstrou que a elastografia ARFI permite identificar as mudanças na elasticidade dos tecidos pulmonares normais relacionadas com o desenvolvimento tecidual dos conceitos ovinos, durante o período gestacional. Adicionalmente, Simões (2016) observou, por meio da elastografia ARFI pulmonar de conceitos caninos, valores qualiquantitativos

constantes durante a última semana gestacional de cadelas, demonstrando pouca variabilidade na elasticidade e desenvolvimento do tecido pulmonar neste período da gestação. Estes resultados demonstram a importância da elastografia pulmonar fetal e permitem sugerir que as variações e anormalidades da elasticidade do órgão (aumento da rigidez) observadas nos fetos com hidropsia foram preditores da sintomatologia e prognóstico dos neonatos acometidos.

Segundo Silva (2017), modificações fisiológicas na rigidez pulmonar (elastografia ARFI) relacionam-se diretamente com o desenvolvimento do tecido pulmonar na fase fetal: preenchimento de espaços pulmonares por líquido pulmonar fetal (responsável pelo crescimento e maturação estrutural) e estruturação pulmonar. O aumento da rigidez pulmonar verificado no exame ARFI qualitativo pode indicar anormalidades na composição final das estruturas pulmonares em conceptos com hidropsia. Ao comparar elastogramas dos fetos anormais (tonalidades mais escuras) com os normais (tonalidades claras) e dados da literatura (Simões, 2016), nota-se que o aumento da rigidez visibilizado nesta técnica qualitativa pode ser indicativo de anormalidades na maturação e desenvolvimento final do pulmão dos fetos.

Por meio da avaliação ARFI quantitativa foi possível verificar com facilidade o aumento da rigidez pulmonar nos fetos com hidropsia, caracterizada por detectar valores elevados para velocidade de cisalhamento (caso 1: 1,05 m/s and caso 2: 1,12 m/s); quando comparados com os fetos normais (0,75 m/s) e aos valores descritos na literatura durante a última semana gestacional de caninos (CI: 0,83 – 0,86 m/s; Simões 2016) e ovinos (CI: 0,57 - 0,67 m/s; Silva 2017). O adequado desenvolvimento e maturação do tecido pulmonar fetal é necessário para adaptação respiratória satisfatória do neonato (Vannucchi *et al.*, 2012). Sugere-se que este aumento de rigidez possa estar relacionado com modificações estruturais dos pulmões dos fetos com hidropsia, comprometendo a maturação e desenvolvimento final deste tecidos, promovendo a disfunção respiratória ocorrida nos neonatos deste relato.

Conclusão

A nova técnica ultrassonográfica (elastografia), atualmente descrita, para avaliação de tecidos pulmonares em fetos anormais em obstetrícia veterinária deve

promover o diagnóstico precoce, seguro e não invasivo de alterações pré e pós-natais em caninos. Conforme observado no presente relato, a técnica facilita um manejo rápido e adequado dos pacientes. Também pode ser usado em estudos futuros sobre o tratamento e controle de anormalidades fetais.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP para a concessão e apoio financeiro para a pesquisa (2012/16635-2).

Referências

- ASSIS, A.R.; MARTIN, C.M.; BABO-TERRA, V.J. Malformações em fetos caninos visibilizadas na ultrassonografia convencional. *Hora Vet.*, v.33, p.64-68, 2013.
- FELICIANO, M.A.R.; MARONEZI, M.C.; PAVAN, L. et al. ARFI elastography as a complementary diagnostic method for mammary neoplasia in female dogs – preliminary results. *J. Small Anim. Pract.*, v.55, p.504-508, 2014.
- FELICIANO, M.A.R.; CARDILLI, D.J.; CRIVELARO, R.M. et al. Hydrallantois in a female dog: a case report. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, p1091-1095, 2013.
- FREITAS, R.C.M. Estudo do volume pulmonar fetal na predição dos resultados perinatais de fetos com derrame pleural “isolado”. 2011. 140f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- ILLANES, S.; HUNTER, A.; EVANS, M. et al. Prenatal diagnosis of echogenic lung: evolution e outcome. *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, v.26, p.145-149, 2005.
- QUARELLO, E.; LACOSTE, R.; MANCINI, J. et al. Shear wave elastography of fetal lungs in pregnant baboons. *Diagn. Interv. Imaging*, v.97, p.605-610, 2016.
- SILVA, P.D.A. Ultrassonografia modo B e elastografia acoustic radiation force impulse (ARFI) de tecidos materno fetais durante a gestação em ovinos. 2017. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- SIMÕES, A.P.R. 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. 2016. 60f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- SRIDEVI, P.; REENA, D.; SAFIUZAMMA, M. Diagnosis of fetal anasarca by real time ultrasonography in a pug bitch e its surgical management. *I. J. Anim. Reprod.*, v.37, p.65-66, 2016.

SOCHA, P.; RUDOWSKA, M.; JANOWSKI, T. Effectiveness of determining the parturition date in bitches using the ultrasonographic fetometry as compared to hormonal e cytological methods. *Pol. J. Vet. Sci.*, v.15, p.447-453, 2012.

TANG, L.; XU, H.X.; BO, X.W. et al. A novel two-dimensional quantitative shear wave elastography for differentiating malignant from benign breast lesions. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, v.8, p.10920-10928, 2015.

VANNUCCHI, C.I.; SILVA, L.C.G.; LÚCIO, C.F. et al. Prenatal e neonatal adaptations with a focus on the respiratory system. *Reprod. Dom. Anim.*, v.47, p.177-181, 2012.

YINON, Y.; KELLY, E.; RYAN, G. Fetal pleural effusions. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, v.22, p.77-96, 2008.

ZHENG, X.Z.; WU, J.; TAN, X.Y. A novel approach to assessing fetal tissue stiffness using virtual touch tissue quantification. *Med. Ultrason*, v.18, p.70-74, 2016.