

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

**ULTRASSONOGRAFIA CONTRASTADA POR
MICROBOLHAS (CEUS) E DOPPLER UMBILICAL NA
GESTAÇÃO DE CADELAS BRAQUICEFÁLICAS**

Priscila Silva
Médica Veterinária

2021

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

**ULTRASSONOGRAFIA CONTRASTADA POR
MICROBOLHAS (CEUS) E DOPPLER UMBILICAL NA
GESTAÇÃO DE CADELAS BRAQUICEFÁLICAS**

Priscila Silva

Orientador: Prof. Dr. Marcus Antônio Rossi Feliciano

Co-orientadores: Dr. Ricardo Andrés Ramirez Uscategui

Dra. Luciana Cristina Padilha Nakaghi

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

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

S586u	Silva, Priscila Ultrassonografia contrastada por microbolhas (CEUS) e Doppler umbilical na gestação de cadelas braquicefálicas / Priscila Silva. -- Jaboticabal, 2021 62 p. : il., tabs. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Marcus Antônio Rossi Feliciano Coorientadora: Luciana Cristina Padilha Nakaghi 1. Cães. 2. Ultrassonografia veterinária. 3. Ultrassonografia Doppler. 4. Meios de contraste (diagnóstico por imagem). 5. Alterações gestacionais. I. Título.
-------	--

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

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**Câmpus de Jaboticabal****CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: ULTRASSONOGRAFIA CONTRASTADA POR MICROBOLHAS (CEUS) E
DOPPLER UMBILICAL NA GESTAÇÃO DE CADELAS BRAQUICEFÁLICAS

AUTORA: PRISCILA SILVA

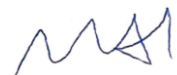
ORIENTADOR: MARCUS ANTÔNIO ROSSI FELICIANO

COORDENADOR: RICARDO ANDRES RAMIREZ USCATEGUI

COORDENADORA: LUCIANA CRISTINA PADILHA NAKAGHI

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

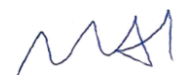
Prof. Dr. MARCUS ANTÔNIO ROSSI FELICIANO (Participação Virtual)
Setor de Diagnóstico por Imagem-UFSM / Santa Maria/RS



Pós-doutorando VICTOR JOSÉ CORREIA SANTOS (Participação Virtual)
Depto de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP – Jaboticabal



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



Prof. Dr. LEANDRO NASSAR COUTINHO (Participação Virtual)
Departamento de Diagnóstico por Imagem - UFRA / Belem,PA



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



Jaboticabal, 03 de março de 2021.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Priscila Silva – Filha de Francisco José da Silva e Sirlei Martiniano da Silva, nascida em 05 de agosto de 1989, em São Paulo/SP, é Médica Veterinária, formada na Universidade Brasil (2013), Câmpus Fernandópolis, São Paulo. Realizou Residência Médica na área de Obstetrícia Veterinária e Reprodução Animal no período de 2014-2016 no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal, São Paulo. Iniciou o curso de Pós-graduação Stricto Senso, sendo Mestre em Cirurgia Veterinária, pela mesma instituição, com bolsa da Capes (2016). Atualmente é Doutoranda em Cirurgia Veterinária também pela mesma instituição, bolsita CNPq, com linha de pesquisa em avaliação ultrassonográfica em cadelas gestantes, sob orientação do Prof. Dr. Marcus Antônio Rossi Feliciano, e coorientação dos professores Dr. Ricardo Andrés Ramirez Uscategui e Dra. Luciana Cristina Padilha Nakaghi.

EPÍGRAFE

*Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso!
Não se apavore, nem se desanime, pois, o Senhor, o seu Deus,
estará com você por onde você andar".*

Josué 1:9

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais,
Francisco José da Silva e
Sirlei Martiniano da Silva.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pelo seu cuidado diário, por ter me dado sabedoria e força para não desistir dos meus sonhos. Deus tinha um plano para a minha vida quando me guiou até Jaboticabal, e eu agradeço de coração tudo que aconteceu na minha vida desde que cheguei aqui.

Agradeço aos meus queridos pais, Francisco e Sirlei por serem meus exemplos de vida, por tudo que conquistaram graças a insistência em serem melhores para educar e criar suas 3 filhas. Por não medirem esforços para me ver feliz, por todas as vezes que abdicaram das suas próprias vontades para fazer a minha e de minhas irmãs. Sem vocês, não sou! Saibam que eu sempre farei o possível e impossível para que vocês se orgulhem de mim. Eu poderia escrever tanto sobre vocês, e ainda assim não conseguiria expressar o quanto me orgulho em ser filha de vocês. Obrigada por serem pais amorosos, cuidadosos, dedicados, e presentes, muito presentes em todos os momentos da minha vida. Ter vocês por perto me passa segurança, é como se a presença de vcs anulasse qualquer coisa negativa que pudesse acontecer comigo. Obrigada por tudo, eu amo vocês! Esse título é NOSSO!

Agradeço as minhas irmãs, Estefane e Natália, por serem o meu maior laço, por ser nós 3, por nos amar do nosso jeitinho único, e sempre entenderem a minha distância física em alguns momentos tão importantes na vida delas, por me ajudem dando apoio, ouvindo quando as coisas não iam tão bem e apoiando meus sonhos e minhas escolhas. Sem o amor de vocês com certeza teria sido muito mais difícil estar longe de casa, mas vocês se fizeram presentes em cada mensagem e ligação por facetime. Eu não poderia ter uma família melhor!

Agradeço aos meus avós, Cícera e Manoel, que eu tanto amo! Por estarem comigo em todos os momentos, por serem o melhor colinho que poderia existir!

Aos meus tios e tias, primos e primas que oraram por mim, e torceram sempre para que eu conseguisse chegar até aqui.

Em especial ao meu primo/irmão Ewerton, por se fazer presente em todos os momentos da minha vida, amigo fiél e conselheiro, muito obrigada.

Ao meu amigo e companheiro Igor Gatto, que teve toda paciência do mundo nessa longa jornada, que dividiu comigo todos os períodos desde a

graduação, residência e pós graduação. Obrigada por caminhar comigo e me apoiar em tantos momentos importantes. Sou sua fã, e sem você teria sido muito mais difícil.

Aos meus pais de coração, Silvana e Moacir, que fazem a maior questão do mundo de nos acompanhar, apoiar e se sentirem felizes com as nossas conquistas como se fosse deles, muito obrigada.

Gostaria de agradecer imensamente ao Mestre e Prof. Wilter, que me abriu as portas na FCAV/Unesp Jaboticabal. Obrigada por tudo, nunca terei palavras para expressar a gratidão e o carinho que eu tenho pelo senhor. Acolhedor e capaz de agrega as pessoas. Nosso pai acadêmico.

Ao meu Orientador Prof. Marcus Feliciano, por ter me recebido para o Mestrado e Doutorado, por todos os ensinamentos, e principalmente a paciência. Obrigada de coração pela confiança em me entregar trabalhos tão importantes, apoio e incentivo. Que Deus continue realizando todos os seus sonhos.

Aos meus co-orientadores, Luciana Padilha que foi essencial na escrita desse trabalho, que me abraçou e acolheu com um carinho de mãe. E ao Ricardo Uscategui, que sempre me ajudou desde a residência até aqui, aprendi muito com você, te admiro e agradeço por ter contribuído para o meu crescimento profissional. Obrigada de coração aos dois!

Gostaria de agradecer com muito carinho a toda família Obstetrícia, pós graduandos e salinha da Reprodução, é difícil citar todos os nomes, pois quando cheguei em 2014 fui muito bem acolhida, e não poderia de deixar de agradecer a cada um que contribuiu de alguma maneira para o meu crescimento pessoal e profissional, foi um grande prazer conhecer, conviver, e aprender com vocês. Essa família que o Prof. Wilter construiu de orientados e agregados com certeza ficará para sempre em meu coração. Nesse sentido, gostaria de agradecer a minha amiga Vivian Tavares, que foi essencial para que tudo acontecesse, obrigada pela amizade e cuidado!! A Marina Brito e Ana Paula Simões que foram as melhores professoras e incentivadoras para que eu fizesse a residência, e a partir dali as oportunidades foram surgindo. Agradeço a vocês por me ensinarem taaaanto. Não tem como chegar até aqui e esquecer do início da caminhada,

desde a primeira oportunidade que foi o estágio. Cresci e me transformei em uma pessoa e profissional melhor, graças a todos vocês que estiveram comigo.

Gostaria de agradecer as minhas grandes amigas Marjory Maronezi, Beatriz Gasser e Letícia Pavan, que me ajudaram em cada processo para que esse trabalho fosse executado, além da amizade fora do ambiente de trabalho. A caminhada não teria sido a mesma sem vocês, formamos o melhor quarteto e eu sempre levarei vocês no meu coração. Amo vocês e obrigada por tudo!

A Priscila Del Aguila, Luiz Paulo Aires, Marcos Vinicius e Aninha que se fizeram tão presentes no final dessa etapa. Obrigada pela amizade, momentos de descontração e carinho, o que tornou essa fase de final de doutorado e pandemia muito mais leve.

Da mesma maneira, todas as residentes que passaram pelo setor de Obstetrícia após a minha saída para a pós graduação. Desejo que vocês sejam muito felizes e realizadas.

Aos funcionários do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, tenho muito carinho e admiração por cada um que contribuiu e participou da minha jornada ao longo desses 7 anos. Gratidão e muitas bençãos para vocês! Em especial ao Arnildo, Edson, Lidiane, Maria Luíza e Prof Mirela. Cada um sabe da importância, carinho e admiração que tenho por eles.

Aos funcionários da Pós Graduação, que sempre estiveram disponíveis para ajudar e tirar dúvidas. Que Deus abençoe cada um de vocês.

Também gostaria de agradecer a todos os amigos que fiz ao longo dessa caminhada, os que estão comigo desde a residência, até a pós graduação. São muitos e seria injusto colocar nomes e esquecer alguém. Graças a Deus tive vocês aqui para me apoiar, escutar nos momentos de tristeza, e também por me fazerem sorrir e tornar a caminhada mais leve. GRATIDÃO, foi maravilhoso ter formado esses laços aqui, quero levar vocês comigo sempre!

Gostaria de fazer um agradecimento especial aos cães que contribuíram com seus animais para o desenvolvimento deste trabalho, Canil Puker's China (Fabiano) e Canil Meu Bulldog Inglês (Sérgio), aos criadores Flávia e Marcus, Joyce e Samuel e ao Ricardo, meu muito obrigada. E principalmente ao Canil Marvin Stars (Marcos e Marcelo), que além do trabalho se tornaram grandes amigos. Gratidão por tudo! Aprendi muito com cada animalzinho que estive comigo durante esses anos, e sou grata pela vida de cada serzinho que passou

pelas minhas mãos. Cuidei, tratei e me apeguei com eles como se fossem meus. Sempre vou me lembrar dos olhinhos brilhando de cada um deles.

Aos professores Eliandra Buttler, Leandro Nassar Coutinho, Felipe da Câmara Barros e Dra. Marjory Maronezi pela participação na banca examinadora, disponibilidade e considerações nesse trabalho.

Agradeço a CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e auxílio pesquisa, Processo 160348/2018-8 .

A Unesp Jaboticabal, que me acolheu, as lágrimas caem dos olhos ao lembrar de cada momento vivido aqui, momentos de crescimento, desafios e descobertas. Obrigada por tudo que você me trouxe. Da mesma maneira a cidade de Jaboticabal, que foi a minha casa, e todas as pessoas que tive o privilégio de conhecer fora da instituição. Sentirei muitas saudades, e lembrarei com muito carinho desse lugar!!!

Aos meus amigos que entenderam a distância física, mas que mesmo assim se fizeram muito presentes em todas as etapas, em especial, Ivonete, Pâmela, Mirela e Mariana Andrade.

Também gostaria de agradecer aos meus companheirinhos Taty, Nick e Tetéia, que estiveram fielmente do meu lado, e trouxeram a paz e alegria que eu precisava. *In memoriam*, Estrelinha , Boris e Fofinho, que sempre estarão vivos no meu coração.

É com muita alegria e GRATIDÃO que finalizo esse ciclo na minha vida. Só tenho a agradecer. E peço a Deus que agora eu possa colher os frutos, e cada dia me sentir mais feliz e realizada na profissão que enche o meu coração de alegria.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Desenvolvimento placentário.....	2
2.2. Circulação fetal.....	3
2.3. Ultrassonografia gestacional modo B e doppler.....	5
2.4. Ultrassonografia contrastada por microbolhas (CEUS).....	8
2.5.Anormalidades na gestação.....	9
REFERÊNCIAS.....	12
CAPÍTULO 2 – Ultrassonografia Contrastada na avaliação da perfusão placentária de cadelas braquicefálicas.....	20
RESUMO.....	21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
<i>Exames ultrassonográficos modo B e doppler.....</i>	26
<i>Contraste microbolhas (CEUS).....</i>	28
Análise estatística.....	29
Resultados.....	30
Gestação Fisiológica.....	31
Anormalidades Gestacionais.....	32
Discussão.....	33
Referências.....	42
CAPÍTULO 3 – Relato de caso: detecção ultrassonográfica de nefrite intersticial em feto canino.....	55
ABSTRACT.....	55
INTRODUÇÃO.....	56
Caso.....	57
Discussão.....	59
Referências.....	61

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 de pesquisa intitulado "**Ultrassonografia contrastada por microbolhas na avaliação do sistema reprodutor de cadelas**", protocolo nº 008978/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcus Antônio Rossi Feliciano, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 05 de julho de 2018.

Vigência do Projeto	01/08/2018 a 01/09/2022
Espécie / Linhagem	Canina / Animais braquicefálicos
Nº de animais	15
Peso / Idade	5 – 15 Kg / 5 a 12 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Rotina dos Serviços da Obstetrícia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias, UNESP/Jaboticabal e de canis criadores da Região de Jaboticabal

Jaboticabal, 05 de julho de 2018.

Fabiana Pilarski
Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 - www.fca.unesp.br

ULTRASSONOGRAFIA CONTRASTADA POR MICROBOLHAS (CEUS) E DOPPLER UMBILICAL NA GESTAÇÃO DE CADELAS BRAQUICEFÁLICAS

RESUMO – Os objetivos dos estudos foram realizar a avaliação da hemodinâmica gestacional fisiológica, envolvendo a dinâmica vascular da artéria umbilical e a perfusão de placentas normais e funcionais e então estabelecer parâmetros qualitativos e quantitativos de referência para cadelas braquicefálicas saudáveis e avaliar a vascularização e perfusão placentária em cadelas com anormalidades fetais próximas ao parto. Foram utilizados 44 fetos, provenientes de 22 cadelas braquicefálicas, e 9 fetos com anormalidades. Os exames ultrassonográficos foram realizados nos três terços da gestação, aos 25, 45 e 58 dias, neste último momento, dos fetos com anormalidade gestacionais. Utilizou-se aparelho ACUSON S2000/SIMENS e transdutor multifrequencial matricial e linear. Foram avaliados dois fetos de cada fêmea, preferencialmente os localizados próximos a região de ovário. O modo doppler espectral foi utilizado para mensuração eletrônica das variáveis dopplerfluxométricas da artéria umbilical: velocidade sistólica (VS), velocidade diastólica (VD), tempo médio de velocidade mínima (TaMin), tempo médio de velocidade máxima (TaMax), índice de pulsatilidade (IP) e índice de resistência (IR). Após, foi realizada a CEUS utilizando o software de imagem harmônica (CADENCE) na avaliação qualitativa do contraste ultrassonográfico, identificando: uniformidade do preenchimento nas regiões placentárias (homogêneo ou heterogêneo), áreas de hipoperfusão, e se ao longo do período gestacional o padrão de realce sofreria alterações em relação a entrada e saída do contraste; e na quantitativa dos parâmetros de perfusão placentários: pico de intensidade do contraste (Fpeak em % de pixels), tempo para o pico (Ftp em s), tempo médio de transmissão (Fmtd em s), área sob a curva (Fauc) e inclinação da curva de entrada em pixels (Fpixels). As variáveis coletadas foram comparadas entre os fetos avaliados (normais e anormais) e entre os momentos pelo teste T-Student e ANOVA e correlacionadas pelo teste de Spearman. Nos fetos saudáveis as variáveis VS, VD, TaMax e TaMin aumentaram significativamente do M2 para o M3 ($P < 0,05$), enquanto o IP ($P < 0,043$) e o IR ($P < 0,001$) diminuíram. Os parâmetros avaliados no CEUS permaneceram constantes durante todos os terços da gestação ($P < 0,05$). Qualitativamente, em todos os momentos avaliados, a distribuição do contraste foi homogênea no tecido placentário. Foi possível acompanhar as adaptações vasculares materno-fetais conforme a progressão da gestação em cadelas, de forma a atender às crescentes demandas metabólicas do feto. Já nos fetos que apresentaram hidropsias os valores de Doppler foram semelhantes aos obtidos nos saudáveis ($P < 0,05$), porém na avaliação com CEUS foi possível verificar uma distribuição heterogênea, com menor intensidade de preenchimento do tecido placentário e um atraso nos tempos de perfusão ($P < 0,05$), com acurácia diagnóstica próxima de 75%. A associação das técnicas dopplerfluxométricas e CEUS permitiu estabelecer parâmetros qualitativos e quantitativos da hemodinâmica gestacional fisiológica, em todos os terços da gestação, sendo possível correlacionar com desenvolvimento e manutenção de todo processo gestacional, sem evidência de alterações significativas na fisiologia do binômio materno-fetal; assim a CEUS demonstrou ser aplicável na detecção de falhas no

preenchimento vascular placentário (disfunção tecidual) em fetos com anasarca e hidrocefalia. Adicionalmente, foram descritos os achados ultrassonográficos de alterações encontrados durante o exame pré natal, de alterações nas estruturas renais de um feto pela da ultrassonografia de alta definição, com descrito no relato de caso presente nesta tese.

Palavras-chave: cães, ultrassonografia veterinária, ultrassonografia Doppler, meios de contraste (diagnóstico por imagem), alterações gestacionais.

CONTRAST-ENHANCED ULTRASOUND (CEUS) AND UMBILICAL DOPPLER IN THE PREGNANCY OF BRAQUICEPHALIC BITCHES

ABSTRACT - The objectives of the studies were to evaluate the physiological gestational hemodynamics, involving the vascular dynamics of the umbilical artery and the perfusion of normal and functional placentas, and then to establish qualitative and quantitative reference parameters for healthy brachycephalic bitches and to evaluate the vascularization and placental perfusion in bitches with fetal abnormalities close to delivery. 44 fetuses were used, from 22 brachycephalic bitches, and 9 fetuses with abnormalities. Ultrasound examinations were performed in the three thirds of pregnancy, at 25, 45 and 58 days, at this last moment, of fetuses with gestational abnormalities. An ACUSON S2000 / SIMENS device and a multi-frequency matrix and linear transducer were used. Two fetuses from each female were evaluated, preferably those located near the ovary region. The spectral doppler mode was used to electronically measure the dopplerfluxometric variables of the umbilical artery: systolic velocity (VS), diastolic velocity (RV), mean minimum velocity time (TaMin), mean maximum velocity time (TaMax), pulsatility index (IP) and resistance index (IR). Afterwards, CEUS was performed using the harmonic imaging software (CADENCE) in the qualitative evaluation of the ultrasound contrast, identifying: uniformity of filling in the placental regions (homogeneous or heterogeneous), areas of hypoperfusion, and whether, throughout the gestational period, the pattern of enhancement would change in relation to the entry and exit of the contrast; and in the quantity of placental perfusion parameters: peak contrast intensity (Fpeak in% of pixels), time to peak (Ftp in s), average transmission time (Fmtt in s), area under the curve (Fauc) and slope of the input curve in pixels (Fpixels). The variables collected were compared between the fetuses evaluated (normal and abnormal) and between the moments by the T-Student and ANOVA tests and correlated by the Spearman test. In healthy fetuses, the variables VS, VD, TaMax and TaMin increased significantly from M2 to M3 ($P < 0.05$), while PI ($P < 0.043$) and IR ($P < 0.001$) decreased. The parameters evaluated in CEUS remained constant during all thirds of pregnancy ($P < 0.05$). Qualitatively, in all evaluated moments, the distribution of contrast was homogeneous in the placental tissue. It was possible to monitor the maternal-fetal vascular adaptations according to the progression of gestation in bitches, in order to meet the increasing metabolic demands of the fetus, which allow it to develop properly. In the case of fetuses that presented hydrops, the Doppler values were similar to those obtained in the healthy ones ($P < 0.05$), however, in the evaluation with CEUS it was possible to verify a heterogeneous distribution, with less intensity of filling of the placental tissue and a delay in the times of perfusion ($P < 0.05$), with diagnostic accuracy close to 75%. The association of flow-through doppler techniques and CEUS allowed to establish qualitative and quantitative parameters of physiological gestational hemodynamics, in all thirds of pregnancy, of healthy brachycephalic bitches, being possible to correlate with the development and maintenance of the whole gestational process of healthy bitches, without evidence of significant changes in the physiology of the maternal-fetal binomial; thus, CEUS proved to be applicable in the detection of flaws in the

placental vascular filling (tissue dysfunction) in fetuses with anasarca and hydrocephalus. In addition, the sonographic findings of alterations found during the prenatal examination, of alterations in the renal structures of a fetus by that of high definition ultrasonography, have been described, as described in the case report in this thesis.

Keywords: dogs, veterinary ultrasound, Doppler ultrasound, contrast media (diagnostic imaging), gestational changes.

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

O exame ultrassonográfico tem grande utilidade como auxílio no diagnóstico e acompanhamento gestacional na cadela (Davidson e Baker, 2009). Foi introduzido para esse fim em 1978 e, desde então vem se expandindo devido à sua eficácia e segurança (Matton e Nyland, 2015). A ultrassonografia é um método preciso e seguro para a fêmea e os fetos, sendo utilizado para confirmação da gestação, estimar a idade gestacional, avaliar a viabilidade fetal, além de diagnosticar condições anormais que possam estar relacionadas a gestação, como subdesenvolvimento fetal, morte fetal e abortamento (Feliciano et al., 2007).

A placenta é um órgão vascular que se forma no decorrer da gestação e por meio dela ocorre a comunicação entre o organismo materno e fetal através do cordão umbilical (Prestes e Alvarenga, 2006). A avaliação desse tecido também é importante considerando que fatores como subdesenvolvimento embrionário podem estar associado a alterações relacionadas a placenta (Johnston et al., 2001).

Com o avanço da tecnologia, a melhora dos transdutores e a melhor resolução de imagem, há maior detalhamento nas avaliações, sendo possível acompanhar com precisão a organogênese, sinais ultrassonográficos de reabsorção, doenças congênitas e hereditárias no pré-natal (Blanco et al., 2011). Com essa evolução tecnológica é possível também estudar a circulação útero-placentária e feto-placentária por meio da ultrassonografia Doppler (Giannico et al., 2015), inclusive auxiliando no diagnóstico de gestações anormais e/ou abortos em cães (Nautrup, 1995; Giannico et al., 2015). O Doppler é um método que, associado à ultrassonografia convencional, fornece informações em tempo real sobre a arquitetura vascular e os aspectos hemodinâmicos dos vasos em diversos órgãos (Carvalho, 2008).

Somando às demais técnicas, a ultrassonografia por contraste microbolhas (CEUS) é um método diagnóstico recente que possibilita a avaliação de alterações hemodinâmicas por meio do estudo das características da perfusão vascular. Este

método avalia a capilarização tecidual através da administração intravenosa das microbolhas, que por apresentarem tamanho semelhante ao das hemácias se difundem tanto na macro como na microcirculação, além de promover aumento do sinal Doppler quando associados, melhorando a qualidade do exame (Feliciano et al., 2019).

Considerando a associação das técnicas ultrassonográficas, os objetivos deste estudo foram determinar a dinâmica vascular da artéria umbilical dos fetos por meio da técnica Doppler e as características qualiquantitativas da perfusão placentária por meio do CEUS e verificar a correlação com desenvolvimento e manutenção do processo gestacional em fetos com e sem anormalidades durante a gestação de cadelas braquicefálicas saudáveis.

2. Revisão de Literatura

2.1 Desenvolvimento placentário

A placentação e o desenvolvimento das membranas fetais na espécie canina atualmente são estudados de forma extensiva, já que o conhecimento da morfologia placentária possibilita reconhecer corretamente suas alterações patológicas e a possível correlação com a viabilidade neonatal (Miglino et al., 2006; Aralla et al., 2013). A placenta é a ligação entre a mãe e feto e tem como função o suprimento de oxigênio e nutrientes, remoção de detritos metabólicos, produção e secreção de hormônios, fatores de crescimento fetal e regulação do ambiente uterino do feto (Prestes; Landim-Alvarenga, 2006). A placenta das cadelas é denominada endotélio-corial e há quatro camadas entre o feto e a mãe, sendo o endotélio materno, o córion, o mesênquima e o endotélio fetal (Roberts, 1986). Em função da disposição dessas camadas ao redor do feto, esse tipo de placenta é denominado zonária. Ela envolve completamente o feto e nas suas margens são observados os hematomas marginais, de coloração esverdeada que são estruturas consideradas lagos sanguíneos, em

contato com o trofoblasto, resultantes do extravasamento de sangue materno (Miglino et al., 2006). Na cadela há eritrofagocitose e endocitose férrica placentária, sendo basicamente a função dos hematomas marginais de facilitar a absorção de ferro (Ambrósio et al., 2009).

A placentação ocorre pela formação e união das membranas fetais ao endométrio, iniciando-se após o período de implantação do embrião no útero, ocorrendo o crescimento externo do mesoderma extra embrionário a partir do trofoblasto e após migração entre o trofoectoderma e endoderma (Prestes; Landim-Alvarenga, 2006). A implantação embrionária se inicia por volta dos dias 16 aos 18 e se completa até o dia 23 da gestação, sendo observado que entre os dias 22 e 23 há invasão do trofoectoderma placentário no endométrio (Thatcher et al., 1994).

2.2 Circulação materno-fetal

A circulação materno-fetal se inicia na fase de placentação, sendo o intercâmbio entre o sangue materno e o sangue fetal. As circulações do feto e da mãe permanecem separadas por camadas de tecidos. O componente fetal da placenta é formado por tecido coriônico vascularizado por vasos alantoidianos e essa separação é feita por três camadas de tecidos: endotélio dos vasos, mesênquima e as células do trofoblasto. A parte materna consiste em outras três camadas de ordem inversa, epitélio uterino superficial, tecido conjuntivo e o endotélio dos vasos maternos. Estas camadas formam a membrana placentária, que consiste em uma barreira conjunta e seletiva entre o fluxo sanguíneo do feto e da mãe, e ao mesmo tempo é uma via de transporte no intercâmbio sanguíneo materno-fetal (Prestes e Landim-Alvarenga, 2006).

Durante a vida fetal, todo oxigênio utilizado pelo feto é de origem materna e difunde-se através da placenta para o sangue fetal. O suprimento de sangue oxigenado é derivado da artéria uterina e das anastomoses que ocorrem das artérias ovarina e vaginal, passa pelo ducto venoso, chega aos átrios esquerdo e direito do feto, aorta e sai pela artéria umbilical (Prestes e Landim-Alvarenga, 2006). Quando o

sangue oxigenado retorna a placenta pela veia umbilical, 50% passa pelos sinusóides hepáticos e o restante sofre um desvio da circulação hepática imediatamente para circulação sistêmica, pelo ducto venoso. Depois de uma pequena passagem pela veia cava, 90 a 95% do sangue chega ao átrio direito e pelo forame oval é direcionado ao átrio esquerdo (Cunningham, 2004; Rodrigues, 2008).

Em torno de 5 a 10% do fluxo sanguíneo que chega ao átrio direito é carregado aos pulmões pelas artérias pulmonares e retorna ao átrio esquerdo sem ser oxigenado. Parte desse sangue, é desviado para a aorta pelo ducto arterioso antes de chegar aos pulmões. Cerca de 40 a 50% do fluxo da aorta descendente passa pelas artérias umbilicais e retorna a placenta para reoxigenação, o restante é destinado a perfusão das vísceras abdominais e a porção caudal do corpo (Crissiuma et al., 2005; Landim-Alvarenga, 2006).

O maior volume de sangue que circula no feto é uma mistura de arterial e venoso, suficiente para as necessidades metabólicas do feto (Mattos, 1997; Cunningham, 2004). Como no período fetal não há respiração pulmonar, os pulmões apresentam-se atelectásicos e repletos por um líquido proveniente do plasma com baixo teor de oxigênio. Durante a vida fetal, a abertura do ducto arterioso é mantida pela menor concentração de oxigênio e pela produção endógena de prostaglandinas, que atuam sobre as células musculares do ducto, mantendo-as relaxadas (Mattos, 1997). Quando o cordão umbilical é rompido, o feto não mais estará ligado à placenta, e começa depender somente de seus pulmões para oxigenação (Landim-Alvarenga, 2006).

O cordão umbilical é o anexo fetal que une o feto a placenta e em seu interior ficam os vasos umbilicais, que são responsáveis pelas trocas sanguíneas entre o feto e a mãe (Michel & Schwarze, 1970). O funículo umbilical dos cães é dividido em três porções: justafetal, terço médio e justaplacentária. Na porção justafetal, existem duas artérias umbilicais cranial e caudal, uma veia umbilical, o pedículo alantóideo e o pedículo do saco vitelino. Já no terço médio, ocorrem as ramificações das artérias umbilicais cranial e caudal dando origem a quatro ramos (primeiro e segundo ramos craniais e caudais. E na porção justaplacentária, temos quatro ramos arteriais e quatro radículas venosas que atingem a placenta, se distribuindo pelos lados esquerdo e direito da cinta placentária, próximo aos hematomas marginais (Zando, 1998).

O crescimento fetal normal depende do aporte eficiente de nutrientes da mãe para o feto, por isso precisa que a perfusão uterina, troca transplacentária de nutrientes e resíduos e a perfusão umbilical estejam funcionando normalmente. As alterações na dinâmica do fluxo sanguíneo placentário são necessárias no crescimento do feto com o avanço da gestação (Baschat et al., 2000; Troedsson e Sage, 2001). A mesma tem um impacto significativo no crescimento e desenvolvimento do embrião/feto (Cremonesi, 2011). A perfusão placentária comprometida influencia de maneira negativa a manutenção e crescimento gestacional saudável (Zhou et al., 2013).

2.3 Ultrassonografia gestacional modo B e Doppler

A ultrassonografia bidimensional (modo B) é a técnica mais utilizada na rotina obstétrica veterinária no pré-natal de fêmeas gestantes por ser considerada segura, precisa, não-invasiva e de baixo custo (Nyland; Mattoon, 2015). Através dessa técnica é possível diagnosticar precocemente a gestação, avaliar a viabilidade fetal e estimar a idade gestacional de forma eficaz (Nepomuceno et al., 2013).

A frequência cardíaca fetal é um dos principais parâmetros utilizados para acompanhar a viabilidade fetal, sendo possível também identificar a proximidade do parto e indicar o momento para uma intervenção com segurança evitando técnicas cirúrgicas prematuras e consequentemente morte neonatal decorrente de imaturidade (Gil et al., 2014).

A ecobiometria é uma técnica importante não somente para prever a idade gestacional, mas também para estudar as estruturas gestacionais e a avaliação anatômica dos fetos ao longo do seu desenvolvimento (Miranda e Domingues, 2010). Dentre os parâmetros fetais importantes mensurados na rotina obstétrica estão os diâmetros bipariental (DBP) e abdominal (DA). O DBP consiste na medida da largura máxima da cabeça utilizando um corte transversal, sendo possível a visualização simétrica dos hemisférios cerebrais e a presença de uma linha hiperecoica central e contínua (Salomon et al., 2011). Já a mensuração do DA é realizada pela medida pela

secção transversal do abdome, na altura do maior diâmetro entre o estômago e a bexiga, tendo a forma arredondada (Camargo et al., 2011). Por meio da mensuração do DBP e DA é possível avaliar o desenvolvimento e bem estar fetal, como crescimento fetal anormal, restrição do crescimento ou crescimento acelerado (Nyberg et al., 2004). Outras medidas já foram descritas na literatura como comprimento do fêmur, largura e comprimento cardíaco, área e volume cardíaco, área do fígado (Miranda e Domingues, 2010).

A ultrassonografia modo-B aplicada de forma independente não fornece informações sobre características hemodinâmicas, por isso sua associação com a técnica Doppler possibilita uma avaliação em tempo real sobre a hemodinâmica materno-fetal auxiliando na identificação de possíveis alterações vasculares (Di Salvo et al., 2006; Blanco et al., 2009). Consequentemente, a ultrassonografia Doppler tem sido muito utilizada para o monitoramento de gestação em cadelas saudáveis (Nautrup, 1998; Di Salvo et al., 2006; Miranda e Domingues, 2010).

A dopplerfluxometria foi introduzida na obstetrícia em medicina por Fitzgerald Drumm (1977), quando utilizaram a onda contínua nas artérias umbilicais pela técnica do dDoppler, e por Gill e Kossoff (1979), quando foi utilizado o Doppler pulsado para medir de forma quantitativa o fluxo umbilical. A dopplerfluxometria veio como grande avanço na prática obstétrica, contribuindo com a redução da mortalidade perinatal, pois começou ser empregada na avaliação materno fetal em casos de gestação de alto risco (Pardi et al., 2002). Os índices Doppler são utilizados como parâmetro de alterações circulatórias e sofrimento fetal, sendo que o aumento dos seus valores indica comprometimento na viabilidade fetal (Papageorgiou et al., 2004). Os principais índices utilizados são o índice de resistividade (IR) e o índice de pulsatilidade (IP), os quais auxiliam na identificação de diversas alterações vasculares, como estenose, trombose ou mais comumente em vasos periféricos com fluxo de resistência aumentados (Cerri et al., 1998; Nyland e Mattoon, 2002). Adicionalmente, a avaliação das artérias umbilicais por meio da técnica Doppler permite identificar insuficiência placentária no sofrimento fetal que apresenta alto índice de mortalidade neonatal (Nicolaidis et al., 2000).

A técnica tornou possível a investigação do fluxo placentário permitindo a avaliação dos principais vasos materno-fetais, como cordão umbilical, artéria aorta e

veia cava caudal dos fetos (Bollwein et al., 2004; Serin et al., 2010). Esses estudos já foram realizados em algumas espécies animais como vaca (Bollwein et al., 2002), égua (Bollwein et al., 2003), rata (Polisca et al., 2010) cadela (Nautrup, 1998; Di Salvo et al., 2006; Miranda e Domingues, 2010) e gatas (Scotti et al. 2008; Brito et al., 2010). Em cadelas e gatas foi observado que a velocidade diastólica final (VDF) e a velocidade de pico sistólico (VPS) dos vasos fetais aumentaram significativamente ao longo da gestação, enquanto o IP e o IR diminuíram nas artérias uteroplacentárias, cordão umbilical, aorta e a veia cava caudal feta, exceto para o IP da aorta (Di Salvo et al., 2006; Scotti et al., 2008).

Inicialmente, a técnica Doppler foi utilizada para determinar os traçados normais de cada vaso sanguíneo, e posteriormente foi possível permitir o reconhecimento de alterações (Carvalho et al., 2008). As formações de ondas obtidas através do Doppler fornecem informações sobre a alteração da conformidade dos vasos fetais. Entre a 5^a e 6^a semana de gestação, observa-se altos valores de IP e IR, que indicam uma alta resistência vascular na placenta canina. Com o desenvolvimento completo do coração e da placenta fetal ocorre a diminuição da resistência e assim, à diminuição dos índices na aorta e na artéria umbilical, chegando aos valores mais baixos cerca de 24 horas antes do parto (Nautrup, 1998; Di Salvo et al., 2006; Giannico et al., 2015). O fluxo umbilical e a hemodinâmica da aorta dos fetos podem ser importantes indicadores de morte neonatal (Madazli et al., 2001). Alterações dessa hemodinâmica materno-fetal podem demonstrar problemas no aporte sanguíneo, trazendo prejuízos ao bem estar do feto. Nautrup (1996) relata que uma formação atípica na onda do Doppler nas artérias uteroplacentárias foi correlacionada com feto subdesenvolvido, vindo este a óbito nos primeiros dias de vida.

2.4 Ultrassonografia contrastada por microbolhas - CEUS

A CEUS é um método de diagnóstico que utiliza microbolhas como contraste para aumentar a detecção dos ecos e quantificar a perfusão orgânica. Essas microbolhas são altamente refletoras, e por esse motivo são capazes de aumentar o sinal Doppler, permitindo a detecção de fluxos dificilmente detectáveis por outros métodos (Nogueira et al., 2002). A quantidade de microbolhas em determinada região observada pela ultrassonografia gera um contraste na região do órgão analisado, permitindo então a detecção de microcirculações que antes poderiam não ser percebidas mesmo durante o exame utilizando o Doppler (Nyman et al., 2005).

As microbolhas contém um gás de elevado peso molecular e tem um diâmetro de 1 a 6 μm , que permite sua passagem no meio dos leitos capilares, somente pelo espaço intravascular, não difundindo para o interstício ou pela excreção urinária, sua utilização é segura e livre de efeitos hemodinâmicos (Kalantarinia e Okusa, 2007). A sua eliminação acontece por via pulmonar (Nyman et al., 2005). Por meio dessa técnica são estabelecidos parâmetros relacionados ao preenchimento tecidual (Volta et al., 2014), mensura o tempo necessário para perfusão do tecido (*"wash-in"*), pico de realce ultrassonográfico (momento em que atinge maior intensidade ecogênica) e o tempo de trânsito total (saída do contraste do parênquima (*"wash-out"*) (Garcia et al., 2015).

Na medicina tem sido utilizada para avaliação da viabilidade miocárdica, na detecção de neoplasias mamárias, isquemia intestinal, enfermidades vasculares hepáticas, no estudo da perfusão renal (Kalantarinia e Okusa, 2007). Em medicina veterinária existem estudos realizados em cães e gatos que utilizaram a microbolhas para avaliação de pâncreas e linfonodos (Haers & Saunders, 2009), fígado (O'brien et al., 2004; Nyman et al., 2005), próstata (Vignoli et al., 2011), testículos (Volta et al., 2014; Brito et al., 2015), avaliação de alterações em baço de cães (Rossi et al., 2008) e também na avaliação renal de cadelas em sepse por piometra (Gasser et al., 2020).

Havia a preocupação sobre a segurança das microbolhas na gestação, e assim os primeiros estudos foram realizados em um modelo experimental com ratas em diferentes tempos da gestação, sendo depois realizados em macacos e humanos,

demonstrando efeitos favoráveis em relação a avaliação hemodinâmica da placenta e seus efeitos colaterais (Orden et al., 2000; Roberts et al., 2016). Como já descrito, o tamanho das microbolhas é semelhante aos glóbulos vermelhos (2-8mm), são intravasculares e não difundem para o interstício do tecido, com isso as microbolhas podem ser utilizadas como rastreadores de sangue (Rim et al. 2001), sem atravessarem a placenta e por esse motivo não são detectadas no feto (Hua et al., 2009).

Em estudo realizado em éguas, foi avaliada a microperfusão placentária através do uso das microbolhas e não foi notado nenhum tipo de efeito adverso nem para os fetos e nem para as mães (Freccero et al., 2017). Estudo recente em cadelas avaliou a placenta e artéria uterina em fêmeas de raças distintas, e concluiu que o uso do contraste é possível sem causar alterações (Orlandi et al., 2019).

A avaliação dos padrões hemodinâmicos na gestação como da placenta e os vasos responsáveis pelo suprimento de nutrientes e aporte sanguíneo para o feto, facilitaria o diagnóstico de falhas na vascularização precocemente e ajudaria no diagnóstico e tratamento quando possível (Reynolds et al. 2006). Sabe-se que em humanos causas de aborto, anomalias fetais e problemas reprodutivos podem estar correlacionados com anormalidades morfológicas ou funcionais da placenta, tendo como principal complicação o fluxo sanguíneo útero-placentário prejudicado (Bracher et al., 1996).

2.5 Anormalidades na gestação

O exame ultrassonográfico tem grande importância durante o período gestacional, pois permite diagnosticar precocemente alterações fetais, como hidropsia (Zeo et al., 2006) e defeitos congênitos (Hecht, 2011). A hidropsia fetal é caracterizada pelo acúmulo de líquido anormal no espaço extravascular, podendo ocorrer coleções de quantidade variáveis na cavidade peritoneal, pleural e pericárdica (Soribas, 2006). A hidropsia fetal pode ser classificada como efusão peritoneal (ascite), anasarca ou síndrome do filhote morsa (edema generalizado no tecido subcutâneo) e hidrocefalia

(acúmulo de líquido no encéfalo) (Toniollo & Vicente, 2003) Em casos de hidropisia é possível por meio da ultrassonografia visibilizar edema no subcutâneo apresentando uma camada anecoica, separando a pele dos tecidos adjacentes do feto, podem ser também visualizados cistos repletos de líquido no tecido subcutâneo (Sorribas, 2009). As maiores prevalências são descritas em raças braquicefálicas como Buldogue Inglês, Buldogue Francês e Pug (Hopper et al. 2004). Podem ser de origem genética ou fatores químicos, físicos e virais (Prabaharan et al., 2016), além de poder ser uma consequência da insuficiência cardíaca congestiva de causa desconhecida (Buchanan, 2001). Os animais afetados apresentam aumento de tamanho que predispõe a casos de distocia (Cunto et al., 2015). Essa patologia pode ser classificada de acordo com o grau de acometimento, como leve, moderado ou grave (Sridevi et al., 2016). O prognóstico é de reservado a grave, e a mortalidade neonatal é alta com pouca chance de sobrevivida (Sorribas, 2009).

A morte fetal também pode ser diagnosticada por meio da ultrassonografia, sendo caracterizada pela ausência de batimentos cardíacos e logo pela ausência de fluxo sanguíneo. Após 12 horas de morte fetal, os órgãos tornam-se menos distintos e, após 24 horas de morte é inviável o reconhecimento dos órgãos. A espinha fetal, costela, crânio, podem ser identificados por mais tempo se o feto se tornar mumificado (Davidson; Baker, 2009). Fetos subdesenvolvidos também podem ser observados, a avaliação é feita por meio da correlação da ecobiometria. Fetos menores tendem a ter um peso corporal menor que os demais, e apresentam risco de morte precoce (Mattoon e Nyland, 2015).

Os defeitos ou malformações congênitas são classificados como anormalidades estruturais ou funcionais de órgãos, que podem interferir na viabilidade fetal ou no bem estar físico do filhote caso ele sobreviva (Pettersson e Kutzler, 2011). Os defeitos genéticos podem levar a mortalidade fetal, sendo herdados de um ou ambos os pais, já os agentes teratogênicos como uso de fármacos, toxinas, doenças infecciosas, influências mecânicas podem afetar a ninhada durante o período gestacional (Casal, 2016). Os agentes teratogênicos podem afetar o desenvolvimento embrionário e fetal, podendo causar a morte do organismo em desenvolvimento, anormalidades estruturais, crescimento alterado e deficiências funcionais (Duong et al., 2011).

Acredita-se que 10% a 15% das anomalias congênitas estruturais ocorrem devido os efeitos adversos de fatores externos no desenvolvimento pré-natal (Gilbert-Barness, 2010), dentre esses fatores não estão apenas fármacos e produtos químicos, mas também infecções virais, condições maternas, nutricionais e fatores físicos (Casal, 2016). Qualquer alteração que ocorra durante o período pré-natal desde a formação do blastocisto, período embrionário e fetal, pode levar a um defeito congênito (Lourenço, 2015). O feto se torna menos suscetível a alterações morfológicas, quando o desenvolvimento da maioria dos órgãos já foi completado (Gilbert-Barness, 2010).

A ultrassonografia Doppler já foi utilizada na avaliação de fetos com anormalidades, comparando os valores de Doppler (IR/PI) em fetos normais e fetos apresentando tipos de anormalidades como hidropsia fetal, hidrocefalia, gastrosquise, subdesenvolvimento e também morte fetal, mumificação e maceração. Freitas et al. (2016) relataram aumento dos valores de IR e PI da artéria umbilical a partir da 6ª semana de gestação em casos de morte fetal e em fetos subdesenvolvidos, aumento de RI a partir da 6ª semana e PI na 7ª semana e em casos de anomalias congênitas aumento dos valores nas artérias uteroplacentárias.

Entretanto, até o momento não foram encontrados estudos fazendo uso da técnica CEUS em fetos que apresentam algum tipo de anormalidade em animais. Em humanos existem poucos trabalhos realizados com CEUS em mulheres gestantes somente para detecção de gestações ectópicas. Ordén et al. (1999) descreveram o uso da técnica em casos de gravidez ectópica, onde foi possível visualizar fluxo sanguíneo pélvico no início da gravidez. Liu et al. (2019) realizaram o uso da técnica em suspeitas de gravidez anormais, nas quais o diagnóstico pelo uso da ultrassonografia transvaginal foi inconclusivo, e com o uso de CEUS foi possível diagnosticar casos de gravidez cicatricial, onde o embrião é implantado no local da gravidez anterior (gravidez ectópica). Baseado nesses estudos, tanto em gestações normais quanto em poucos trabalhos realizados em gestações com algum tipo de alteração, acreditamos que CEUS seja um método promissor de diagnóstico de alterações no fluxo sanguíneo placentário e/ou anormalidades gestacionais, e que possa auxiliar na detecção precoce de alterações que possam comprometer a gestação.

3. REFERÊNCIAS

Ambrósio CE, Martins DS, Miglino MA (2009) Biologia do desenvolvimento em cães: comportamento do embrião/feto em relação a placenta. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 6:133.

Aralla M, Groppetti D, Caldarini L, Cremonesi F, Arrighi S (2013) Morphological evaluation of the placenta and fetal membranes during canine pregnancy from early implantation to term. **Research in Veterinary Science** 5:15-22.

Baschat AA, Gembruch U, Reiss I, Gortner LCP, Weiner P, Harman CR (2000) Relationship between arterial and venous Doppler and perinatal outcome in fetal growth restriction. **Ultrasound Obstet Gynecology** 16:407-413.

Blanco, P.G. et al. (2009) An experimental model to study resistance index and systolic/diastolic ratio of uterine arteries in adverse canine pregnancy outcome. **Reproduction in Domestic Animals** 44:164-166.

Blanco PG, Rodríguez R, Rube A, Arias DO, Tórtora M, Díaz JD, Gobello C (2011) Doppler ultrasonographic assessment of maternal and fetal blood flow in abnormal canine pregnancy. **Animal Reproduction Science** 126: 130–135.

Blanco PG, Totóra M, Rdríguez R, Arias DO, Gobello C (2011) Ultrasonographic assessment of maternal cardiac function and peripheral circulation during normal gestation in dogs. **Veterinary Journal** 190:154-159.

Bollwein H, Baumgartner U, Stolla R (2002) Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during pregnancy. **Theriogenology** 57:2053–2061.

Bracher V, Mathias S, Allen WR (1996) Influence of chronic degenerative endometritis (endometrosis) on placental development in the mare. **Equine Veterinay Journal** 28:180–188.

Brito AB, Miranda SA, Ruas MR, Santos RR, Domingues SFS (2010) Assessment of feline fetal viability by conceptus echobiometry and triplex Doppler ultrasonography of uterine and umbilical arteries. **Animal Reproductin Science** 122:276-281.

Brito M, Feliciano M, Coutinho LN, Uscategui R R, Simões A, Maronezi, MC, Russiano WR (2015) Doppler and contrast- enhanced ultrasonography of testicles in adult domestic felines. **Reproduction in Domestic Animals**, 50:730–734.

Buchanan JW (2001) Pathogenesis of single right coronary artery and pulmonic stenosis in English Bulldogs. **Journal. Veterinary Internal Medicine**, 15:101-104.

Camargo NI, Berlim AT, Magalhães FJR, Manso Filho HC, Wishral A (2016) Biometria fetal em cadelas da raça Shih-Tzu através de ultrassonografia. **Veterinária e Zootecnia** 23(4):604-612.

Carvalho CF, Chammas, MC, Cerri, GG (2008) Morfologia duplex Doppler dos principais vasos sanguíneos abdominais em pequenos Animais. **Ciência Rural, Santa Maria** 38:880-888.

Casal, ML (2016). Congenital and genetic diseases of puppies before the weaning: can we prevent them? In: **VIII International Symposium on Canine and Feline Reproduction, Paris**.

Cerro GG et al. (1998) Avaliação dúplex do fígado, sistema portal e vasos viscerais. In: _____ Doppler. São Paulo: Sarvier 6:120-121.

Cremonesia F, Corradettib B, Consiglio Lange A (2011) Fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: progress and perspectives **Theriogenology** 75:1400–1415.

Crissiuma AL, Labarthe NV, Soares AMB, Juppa Jr CJ, Mannarino R, Gershony LC (2005) Aspectos cardiorrespiratórios e ácidos-básicos do período de transição fetal-neonatal em cães. **Revista Clínica Veterinária** 57:36-40.

Cunningham JG (2004) Transporte de oxigênio fetal e neonatal. In. Cunningham JG. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 492-496.

Cunto M, Zambelli, D, Castagnetti C, Linta, N, & Bini, C. (2014). Diagnosis and treatment of foetal anasarca in two English bulldog puppies. **Pakistan Veterinary Journal** 35:251– 253.

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

Di Salvo P, Bocci F, Zelli R, Polisca A (2006) Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in the bitch. **Veterinary Science** 81:382-388.

Duong A, Steinmaus C, Mc-hale CM, Vaughan CP, Zhang L (2011). Reproductive and developmental toxicity of formaldehyde: a systematic review. **Mutatation Reserch** 728, 118-138.

Feliciano MAR, Muzzi LAL, Leite CAL, Junqueira MA (2007) Two-dimensional conventional, high resolution two-dimensional and three-dimensional ultrasonography in the evaluation of pregnant bitch. **Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e zoootenia** 59:1333-1337.

Feliciano MAR, Assis AR, Vicente WRR (2019) **Ultrassonografia em cães e gatos**. Editora MedVet 45.

FitzGerald DE, Drumm JE (1977) Non-invasive measurement of human fetal circulation using ultrasound: a new method. **British Medical Journal** 2:1450–1451.

Freccero F, Toaldo MB, Castagnetti C, Cipone M, Diana A (2017) Contrast-enhanced ultrasonography (CEUS) of the uterus during normal equine pregnancy: preliminary report in two mares. **Journal of Equine Veterinary Science** 54:42-49.

Freitas LA, Mota GL, Silva HVR, Carvalho CF, Silva LDM (2016) Can maternal-fetal hemodynamics influence prenatal development in dogs? **Animal Reproduction Science** 172:83- 93.

Garcia PHS, Crivellenti LZ, Feliciano MAR (2015) Rins. In: Feliciano MAR, Canola JC, Vicente WRR (Eds) **Diagnóstico por imagem em cães e gatos** São Paulo:MedVet, p. 411-439.

Gasser B, Uscategui RAR, Maronezi, MC, Pavan L., Simões APR, Martinato F, Silva P, Crivellenti LZ, & Feliciano MAR (2020) Clinical and ultrasound variables for early diagnosis of septic acute kidney injury in bitches with pyometra. **Scientific Reports** 10: 8994.

Giannico MT, Gil MEU, Garcia DA A, Froes TR (2015) The use of Doppler evaluation of the canine umbilical artery in prediction of delivery time and fetal distress. **Animal Reproduction. Science** 154:105 – 112.

Gil EM, Garcia DA, Giannico AT, Froes TR (2014) Canine fetal heart rate: do accelerations or decelerations predict the parturition day in bitches? **Theriogenology** 15:933-941.

Gilbert-Barness E (2010) Teratogenic causes of malformations. **Annals of Clinical & Laboratory Science** 2: 99– 114.

Gill RW, Kossoff G (1979) Pulsed Doppler combined with B-mode imaging for blood flow measurement. **Contrib Gynecology Obstetrics** 6:139–141.

Haers H & Saunders JH (2009) Review of clinical characteristics and applications of contrast-enhanced ultrasonography in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association** 234:460-470.

Hecht S (2011) Trato reprodutor feminino. In: PENNINCK, D; D'ANJOU, M. **Ultrassonografia de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.395-414.

Hopper BJ, Richardson JL, & Lester NV (2004). Spontaneous antenatal resolution of canine hydrops fetalis diagnosed by ultrasound. **Journal of Small Animal Practice** 45: 2–8.

Hua X, Zhu L-P, Li R, Zhong H, Xue YF, et al. (2009) Effects of diagnostic contrast-enhanced ultrasound on permeability of placental barrier: A primary study. **Placenta** 30: 780–784.

Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS (2001) Canine and feline **Theriogenology**. Philadelphia, p. 592.

Kalantarinia K, Okusa M (2007) Ultrasound Contrast Agents in the Study of Kidney Function in Health and Disease. *Drug Discovery Today*. **Disease Mechanism** 4:153-158.

Liu D, Gu X, Liu F et al. (2019) Application of contrast-enhanced ultrasound for scar pregnancy cases misdiagnosed as other diseases. **Clinica Chimica Acta** 496:134–139.

Lourenço MLG (2015) **Cuidados com neonatos e filhotes**. In: Jericó MM, Kogika MM, De Andrade Neto JP. Tratado de medicina interna de cães e gatos. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan.

Madazli R, Uludag, S, Ocak V (2001) Doppler assessment of umbilical artery, thoracic aorta and middle cerebral artery in the management of pregnancies with growth restriction. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, 80:702-707.

Mattoon JS, Nyland TG (2015) Ovaries and uterus. In: Mattoon, J.S., Nyland, T.G. (Eds.), **Small Animal Diagnostic Ultrasound**. 3rd ed. Elsevier, Canada, pp. 634-654, 2015.

Mattos SS (1997) Fisiologia da circulação fetal e diagnóstico das alterações funcionais do coração do feto. **Arquivo Brasileiro Cardiologia** 69:205-207.

Michel G, Schwarze E (1970) Embriología. In: SCHWARZE, E. **Compendio de anatomía veterinária**. Acribia: Zaragoza Cap.6. p.136-143.

Miglino MA, Ambrósio CE, Martins D S, Wenceslau CV, Pfarrer C, Leiser R (2006) The carnivore pregnancy: The development of the embryo and fetal membranes. **Theriogenology** 66:1699-1702.

Miranda SA, Domingues SFS (2010) Conceptus ecobiometry and triplex Doppler ultrasonography of uterine and umbilical arteries for assessment of fetal viability in dog. **Theriogenology** 74:608-617.

Nautrup CP (1998) Doppler ultrasonography of canine maternal and fetal arteries during normal gestation. **Journal of Reproduction Fertility** 112:301-314.

Nautrup PC (1996) Hannover. **Duplexsonographie**. In: Atlas und Lehrbuch der Ultraschalldiagnostik bei Hund und Katze, p 314-322.

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

Nicolaides, RH, Rizzo G, Hecher K (2000) Methodology of Doppler assessment of the placental and fetal circulation. In placental and fetal Doppler. **Partenon Publishing: Carnforth** 41 -42.

Nogueira AC, Morcerf F et al (2002) Ultrassonografia com agentes de contrastes por microbolhas na avaliação da perfusão renal em indivíduos normais. **Revista Brasileira de Ecocardiografia** 15:74-78.

Nyberg DA, Abuhamad A, Ville Y (2004) Ultrasound assessment of abnormal fetal growth. **Seminars in Perinatology** 28:3–22

Nyland TG, Mattoon JS (2002) **Ovaries and uterus**. In: Small Animal Diagnostic Ultrasound. 2ed. Philadelphia:WB Saunders, p.231-249.

Nyman HT, Kristensen AT, Kjølgaard-Hansen M. & Mcevoy FJ (2005) Contrast-enhanced ultrasonography in normal canine. **Veterinary Radiology and Ultrasound** 46:243-250.

O'brien R, Iani M, Matheson, J, Delaney, F. & Young, K (2004) Contrast harmonic ultrasound of spontaneous liver nodules in 32 dogs. **Veterinary Radiology and Ultrasound** 45:547-533.

Ordén MR, Gudmundsson S, Helin HL, Kirkinen P (1999) Intravascular contrast agente in the ultrasonography of ectopic pregnancy. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology** 14:348–352.

Orden MR, Leinonen M, Kirknen P (2000) Contrast-enhanced ultrasonography of uteroplacental circulation does not evoke harmful CTG changes or perinatal events. **Fetal Diagnosis Therapy** 15:139-145.

Orlandi R, Vallesi E, Boiti C, Polisca A, Troisi A, Righi C, Bargellini P (2019) Contrast-enhanced ultrasonography of maternal and fetal blood flows in pregnant bitches. **Theriogenology** 125:129-134.

Papageorgiou AT, Yu CKH, Nicolaides, KH (2004) The role of uterine artery Doppler in predicting adverse pregnancy outcome. Best Practice & Research. **Clinical Obstetrics & Gynaecology** 18:383–396.

Pardi G, Marconi AM, Cetin I (2002) Placental-fetal interrelationship in IUGR fetuses: a review. **Placenta** 23:136-141.

Peterson, ME, Kutzler, MA (2011). **Small Animal Pediatrics** (1nd ed.). Saint Louis: Elsevier.

Polisca A, Scotti L, Orlandi, R, Brecchia G, Boiti C (2010) Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in rabbits. **Theriogenology** 73:358-366.

Prabaharan V, Sivakumar A, Jayaganthan P, Raja S, Vijayarajan A and Sathesh Kumar S (2016) Dystocia due to fetal anasarca and ascities with live fetus in a doe. **International Journal of Environmental Science and Technology** 5(4): 2586-2589.

Prestes NC, Landim-Alvarenga FC (2006) **Obstetrícia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan p. 241.

Prestes NC, Landim-Alvarenga, FC (2006) **Obstetrícia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 241.

Reynolds LP, Caton JS, Redme DA, Grazul-Bilska AT, Vonnahme KA, Borowicz PP, et al. (2006) Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. **The Journal of Physiology** 572:51-58.

Rim SJ, Poi HL, Lindner JR, Couture D, Ellegala D, et al. (2001) Quantification of cerebral perfusion with real-time contrast-enhanced ultrasound. **Circulation** 104: 2582–2587.

Roberts SJ (1986) **Veterinary obstetrics and genital diseases**. (Ed.). Ann Arbor: Edward Brothers, 1986.

Roberts VH, Lo JO, Salati JA, Lewandowski KS, Lindner JR, Morgan TK, Frias AE (2016) Quantitative assessment of placental perfusion by contrast-enhanced ultrasound in macaques and human subjects. **American Journal of Obstetrics and Gynecology** 369:1-8.

Rodrigues MIG (2008) **Tratamento da hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido** 90f. Tese (Mestrado em Medicina) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal.

Rossi F, Leone V, Vignoli M, Laddaga E. & Terragni R (2008) Use of contrast-enhanced ultrasound for characterization of focal splenic lesions. **Veterinary Radiology and Ultrasound** 49:154-164.

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

Scotti L, Di Salvo P, Bocci F, Pieramati C, Polisca A (2008) Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in queen. **Theriogenology** 69:1111-1119.

Sorribas CE (2009) **Manual de emergências e afecções frequentes do aparelho reprodutor em cães**. 1. ed. São Paulo: Editora MedVet.

Souza TD, Mol JPS, Paixão TA, Santos RL (2017) Mortalidade fetal e neonatal canina: etiologia e diagnóstico **Revista Brasileira de Reprodução Animal** Belo Horizonte 41:639-649.

Sridevi P, Reena D, Safiuzamma M (2016) Diagnosis of fetal anasarca by real time ultrasonography in a pug bitch and its surgical management. I. J. **Animal Reproduction**. 37:65-66.

Thatcher M-JD, Shille VM, Buhi WC, Alvarez IM, Concannon PW, Thibeault D, Cotton M (1994) Canine conceptus appearance and de novo protein synthesis in relation to the time of implantation. **Theriogenology** 41:p.1679-1692.

Toniollo GH, Vicente WRR (2003) **Manual de obstetrícia veterinária**. São Paulo: Livraria Varela, p.57-60.

Troedsson M, Sage AM (2001) Fetal/placental evaluation in the mare. In: BALL, B.A. (Ed) **Recent advances in equine reproduction**. Ithaca: International Veterinary Information Service.

Volta A, Manfredi S, Vignoli M, Russo M, England G, Rossi F et al (2014) Use of Contrast-Enhanced Ultrasonography in Chronic Pathologic Canine Testes. **Reproduction in Domestic Animals** 49:202-209.

Zanco, N.A. **Pesquisa anatômica das artérias e veias do funículo umbilical, sua ramificação e disposição na placenta de cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758)**. 1998. 187f. Tese (Doutorado em Anatomia dos animais domésticos) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo.

Zeo GB, Molina EM (2006) Uso de La ultrasonografia en el aparato reproductor. In: WAnKE, M. M.; GOBELLO, C. **Reproduccion em caninos y felinos domésticos** 1ºed. Buenos Aires: Inter-Médica 13:159-173.

Zhou YJ, Yuan ML, Li R, Zhu LP (2013) Real-Time Placental Perfusion on Contrast-Enhanced Ultrasound and Parametric Imaging Analysis in Rats at Different Gestation Time and Different Portions of Placenta. **PLoS ONE** 8: e58986.

CAPÍTULO 2 – Ultrassonografia contrastada na avaliação da perfusão placentária em cadelas braquicefálicas¹

Priscila Silva¹, Marjory Cristina Maronezi¹, Luciana Cristina Padilha-Nakaghi¹, Beatriz Gasser¹, Letícia Pavan², Luiz Paulo Nogueira Aires¹, Marco Russo³, Ricardo Andrés Ramirez Uscategui⁴ e Marcus Antônio Rossi Feliciano^{1,5}

¹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

²Médica Veterinária autônoma.

³Università de Napoli, Federico II, Napoli, Itália.

⁴Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Unaí, Minas Gerais, Brasil.

⁵Setor de Diagnóstico por Imagem, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

***Autor correspondente:** Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade de Santa Maria, Av. Roraima nº 1000 Cidade Universitária Bairro - Camobi, 97105-900 Santa Maria - RS. E-mail: marcusfeliciano@yahoo.com.br

Título resumido: CEUS na hemodinâmica gestacional de cadelas braquicefálicas

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido a revista *Biology of Reproduction* e encontra-se em avaliação para publicação.

Resumo da sentença

Dopplerfluxométricas e CEUS permitiram estabelecer a caracterização da perfusão placentária e obtenção de parâmetros qualitativos e quantitativos da hemodinâmica gestacional fisiológica de cadelas braquicefálicas saudáveis nos 25º, 45º e 58º dias gestação, de forma segura e sem influenciar no processo fisiológico do binômio materno-fetal; CEUS permite detecção de disfunção placentária em fetos caninos com hidropsia.

Resumo

Objetivou-se: i) estudar a hemodinâmica placentária fisiológica durante a gestação e estabelecer parâmetros qualitativos e quantitativos para cadelas braquicefálicas; ii) avaliar a vascularização e perfusão placentária em cadelas com anormalidades fetais próximas do parto. Foram avaliados 44 fetos saudáveis, de 22 cadelas braquicefálicas, e 9 fetos com anormalidades gestacionais (anasarca e hidrocefalia), de 8 cadelas braquicefálicas. Todas as cadelas haviam sido submetidas à inseminação artificial intravaginal e submetidas a cesariana ao final da gestação. O diagnóstico gestacional ocorreu no 25º dia e as avaliações experimentais foram realizadas no 25º (M1), 45º (M2) e 58º (M3) dias de gestação nas gestações normais; neste último momento, fetos com anormalidades gestacionais foram avaliados. Foram obtidos valores ecobiométricos da placenta e dos fetos pelo modo B; índices vasculares pela dopplerfluxometria da artéria umbilical; e realizada avaliação qualitativa de preenchimento do contraste e quantitativa dos parâmetros de perfusão placentários pelo CEUS. As variáveis foram comparadas entre os fetos avaliados (normais e anormais) e entre os momentos pelo teste t-Student e ANOVA, e correlacionadas pelo teste de Spearman. Nos fetos saudáveis a velocidade sistólica e diastólica e os tempos médios de velocidades mínima e máxima aumentaram

significativamente do M2 para o M3 ($P<0,05$), enquanto o índice de pulsatilidade ($P<0,043$) e de resistência vascular ($P<0,001$) diminuíram. A distribuição do contraste foi homogênea nos tecidos placentários em todos os momentos e os parâmetros de preenchimento da CEUS permaneceram constantes durante os momentos avaliados ($P<0,05$). Nos fetos com hidropsias os valores de Doppler foram semelhantes aos obtidos nos saudáveis ($P>0,05$), porém na avaliação CEUS foi possível verificar uma distribuição heterogênea, com menor intensidade de preenchimento do tecido placentário e um atraso nos tempos de perfusão ($P<0,05$), com acurácia diagnóstica próxima de 75%. A associação da dopplerfluxometria e CEUS permitiu estabelecer parâmetros qualitativos e quantitativos da hemodinâmica gestacional fisiológica em três momentos gestacionais, sem evidência de alterações significativas na fisiologia do binômio materno-fetal; a CEUS demonstrou ser aplicável na detecção de falhas no preenchimento vascular placentário (disfunção tecidual) em fetos com anasarca e hidrocefalia.

Palavras-chave: caninos, perfusão placentária, CEUS, anormalidades gestacionais

Introdução

Uma das fases primordiais da gestação canina é a implantação, na qual o blastocisto se une à parede uterina (Landim Junior, 2015) e as células trofoblásticas migram para o interior do endométrio, até entrar em íntimo contato com as artérias espiraladas, o que promove mudanças estruturais do endotélio vascular. Dentre elas, a redução da cobertura muscular torna os vasos mais complacentes e estabelece conexões de baixa resistência vascular (Lin et al., 1995) e consequentemente de baixa pressão (Longo, 1983). Desta forma, estabelece-se o leito vascular útero placentário, o qual cresce de forma gradual ao desenvolvimento da gestação (Nautrup, 1998; Di Salvo et al., 2006; Blanco et al., 2009).

Essas mudanças estruturais e as alterações bioquímicas que ocorrem durante o período gestacional desencadeiam uma modificação morfofisiológica do sistema cardiovascular, para responder às crescentes demandas metabólicas da unidade materno-embrionária ou materno-fetal, mediante o aumento progressivo do débito cardíaco (Almeida et al., 2017). O complexo de alterações hemodinâmicas resulta na perfusão adequada dos conceitos mediante uma interfase uteroplacentária vascular formada pelas artérias espirais que, além de crescer conforme o desenvolvimento gestacional, adaptam-se ao crescimento dos tecidos embrionários e fetais mediante a redução progressiva da sua resistência vascular (Di Salvo et al., 2006).

O Doppler foi a técnica de imagem ultrassonográfica que permitiu a identificação da maioria destas adequações hemodinâmicas em cadelas gestantes (Di Salvo et al., 2006; Blanco et al., 2009; Almeida et al., 2017). Mediante a avaliação dos índices dopplerfluxométricos dos vasos placentários, parâmetros que estimam de forma não invasiva o fluxo sanguíneo arterial e a resistência vascular periférica, foi possível evidenciar e correlacionar com o exame histopatológico das artérias espirais, o aumento progressivo do fluxo sanguíneo placentário, decorrente do aumento no diâmetro destes vasos e da redução em sua resistência (Di Salvo et al., 2006). Com estes preceitos, considera-se que a avaliação dopplerfluxométrica das estruturas placentárias e/ou fetais permite acompanhar e monitorar o desenvolvimento do processo gestacional, predizer o momento do parto, inferir sofrimento fetal e identificar anormalidades do desenvolvimento fetal, proporcionando ferramentas para um acompanhamento clínico gestacional mais acurado (Divon & Ferber, 2001; Harman & Baschat, 2003; Giannico et al., 2016).

Com o avanço tecnológico da ultrassonografia, foi disponibilizada a técnica de ultrassonografia contrastada por microbolhas (CEUS), que permite realizar exame mais acurado da hemodinâmica tecidual, pois possibilita a visualização da microcirculação e avaliação

qualitativa e quantitativa da perfusão (Cosgrove, 2006; Bargellini et al., 2018). A técnica CEUS já demonstrou ser segura para a avaliação hemodinâmica do binômio materno-fetal em primatas, roedores, equinos e caninos (Zhou et al., 2013; Roberts et al., 2016; Freccero et al., 2017; Orlandi et al., 2019), sendo considerado os estudos com animais gestantes, modelo experimental apropriado para futuras aplicabilidades em mulheres gestantes (Roberts & Frias, 2020).

Especificamente em cadelas gestantes, um estudo recente avaliou com a CEUS a hemodinâmica placentária no primeiro e segundo terço da gestação fisiológica em nove cadelas (Orlandi et al., 2019). Além de apontar a aparente segurança da técnica, os autores identificaram a perfusão placentária sem difusão do contraste para os tecidos embrionários ou fetais, sem verificar mudanças significativas nas variáveis quantitativas de perfusão nos primeiros 45 dias de gestação, e por isso recomendaram a realização de novos estudos com um número maior de fêmeas e em fases diferentes da gestação.

Estudos recentes em primatas não humanos têm demonstrado a importância da CEUS na detecção in vivo da disfunção placentária, associada à restrição proteica na dieta (Roberts et al., 2018), consumo crônico de dietas ricas em gordura (Kuo et al., 2019; Salati et al., 2019) e em primatas não humanos infectados por Zica vírus (Hirsch et al. 2018), verificada pela redução das taxas de perfusão sanguíneas placentárias. Este potencial da CEUS para detecção de anormalidades na função placentária poderá auxiliar na intervenção médica precoce, visando melhorar a conduta pré-natal e obtenção de proles saudáveis, e permitir estudos mais completos sobre a disfunção placentária nas diversas espécies. Até o momento não há estudo sobre a aplicabilidade da CEUS na avaliação placentárias de hidropsias ou em anormalidades em fêmeas caninas.

Sumarizando, é possível inferir que as alterações fisiológicas da resistência vascular têm papel vital na garantia de um fluxo sanguíneo placentário adequado a gestação, e que o Doppler é uma técnica ultrassonográfica eficiente para a avaliação destas modificações hemodinâmicas. No entanto, não há evidência suficiente que permita distinguir as alterações da perfusão placentária decorrentes da gestação, mediante a avaliação com CEUS ou a sua importância na detecção de anormalidades gestacionais em cadelas. Consequentemente, considera-se de relevância o estudo da hemodinâmica gestacional fisiológica e de alterações gestacionais em cadelas braquicefálicas, mediante as técnicas Doppler e CEUS, nos diferentes estágios deste processo. Portanto, objetivou-se: i) estabelecer parâmetros qualitativos e quantitativos de referência para fetos de cadelas braquicefálicas saudáveis; e ii) avaliar a vascularização e perfusão placentária em cadelas com anormalidades fetais, identificadas próximas ao parto, com o intuito de instituir dados que permitam a detecção precoce de anormalidades gestacionais relacionadas à disfunção placentária, assim como subsidiar o estudo da hemodinâmica gestacional em outras raças e espécies.

Materiais e métodos

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 (003074/19). Foram incluídas 30 fêmeas de raças braquicefálicas, com peso de $11,3 \pm 1,6$ kg e idade de $2,7 \pm 1,0$ anos, consideradas saudáveis pela ausência de anormalidades ao exame físico, hematológico, bioquímico sanguíneo e ultrassonográfico abdominal.

Os proprietários destes animais são criadores profissionais com os quais se tem acordos de cooperação e permitiram a participação de suas cadelas neste estudo, mediante assinatura de

termo de consentimento livre e esclarecido. Os funcionários destes canis foram treinados para detectar sinais de proestro, que são o edema e o sangramento vulvar. Quando as cadelas apresentavam estes sinais era realizada citologia vaginal todos os dias até detectar 80% de células superficiais anucleadas como indicativo de estro (Socha et al., 2012). Após esta confirmação a concentração sérica de progesterona (P4) era mensurada diariamente pelo método de quimioluminescência, considerando o momento de ovulação quando o resultado apontar $P4 > 4,0$ ng/ml (Gloria et al., 2018) Neste momento as fêmeas eram submetidas a três inseminações artificiais intravaginais, utilizando sêmen fresco, com intervalo de 48 horas (Jacomini et al., 2006). Para o estudo foi considerando o dia posterior à primeira inseminação, como o primeiro dia do processo gestacional, o diagnóstico ultrassonográfico da gestação foi realizado no 25º dia, utilizando o aparelho ACUSON S2000® (Siemens, Munique, Alemanha) e probe linear de 9,0MHz, de acordo com os parâmetros definidos por Lopate (2008), com esta confirmação a fêmea era submetida aos exames posteriores.

Exames ultrassonográficos ao modo B e Doppler

Previamente ao exame, foi realizada tricotomia da região abdominal e aplicado gel de ultrassom sobre a pele da região, em seguida, as cadelas foram posicionadas em decúbito lateral ou dorsal, mediante contenção física manual. O transdutor foi posicionado na área abdominal e todas as configurações do aparelho de ultrassom (profundidade, ganho, índice mecânico e foco) foram ajustadas para garantir uma imagem de qualidade, esses ajustes foram padronizados durante todas as avaliações. Os exames foram realizados por um único operador experiente, a fim de reduzir o tempo de avaliação, promover o mínimo estresse para os animais e verificar de forma consistente os exames e o desenvolvimento da gestação (Yeager et al., 1992; Socha et al., 2012; Simões et al., 2018). Durante a avaliação ultrassonográfica, inicialmente a idade gestacional era

confirmada, por meio de fórmulas para sua estimativa, recomendadas por Yeager et al. (1992) e Mattoon e Nyland (2015).

As coletas de dados foram realizadas em momentos diferentes da gestação, no 25° (M1), 45° (M2) e 58° (M3) dias de gestação. Preferencialmente foram selecionados para avaliação, os dois fetos mais próximos aos ovários esquerdo e direito no M1 e M2, na tentativa de avaliar sempre os mesmos indivíduos em cada matriz. No M3 além do exame descrito para os outros momentos, realizava-se uma avaliação completa e ampla de todos os fetos visíveis, com o intuito de identificar possíveis anormalidades morfofisiológicas. Os dados coletados nos diversos momentos das fêmeas que apresentassem qualquer anormalidade nos seus fetos/neonatos foram retirados da avaliação fisiológica e apenas os dados dos fetos anormais no M3 foram utilizados para comparação com o mesmo momento das gestações saudáveis.

A ultrassonografia modo B foi utilizada para avaliação do desenvolvimento, viabilidade fetal, detecção de alterações do desenvolvimento, mensuração do diâmetro biparietal e abdominal (Feliciano et al., 2015). Ao modo Doppler pulsado era também mensurada a frequência cardíaca (Fartow, 1996).

Finalizadas estas avaliações era ativado o modo Doppler colorido, para auxiliar na localização da artéria umbilical conforme descrito por Giannico et al. (2016). Uma vez identificada a artéria, ativava-se o modo Doppler espectral, o cursor para a amostragem vascular era posicionado no centro do cordão umbilical, tomando cuidado para que o ângulo entre o feixe do cursor e o eixo do vaso fosse superior a 60° e o tamanho deste cursor de amostragem foi fixado entre 2 e 3 mm.

Uma vez cumpridos estes requisitos, eram avaliados e gravados os traçados espectrais de fluxo até conseguir ondas de qualidade com o mínimo de artefatos possível. Três ondas de fluxo destes traçados eram selecionadas para a mensuração eletrônica das variáveis

dopplerfluxométricas: velocidade sistólica (VS), velocidade diastólica (VD), tempo médio de velocidade mínima (TaMin), tempo médio de velocidade máxima (TaMax), índice de pulsatilidade (IP) e índice de resistência (IR) (Gasser et al., 2020). Estas avaliações, assim como a mensuração da frequência cardíaca foram realizadas antes e imediatamente depois da administração do contraste ultrassonográfico, com intuito de avaliar possíveis efeitos deste contraste na hemodinâmica placentária e fetal (Freccero et al., 2017).

Ultrassonografia contrastada por microbolhas (CEUS)

Após o exame ao modo B e Doppler foi realizada a CEUS, utilizando-se o software de imagem harmônica (CADENCE - contrast pulse sequencing technology, Siemens, Munich, Germany), com índice mecânico fixado em 0,09 (M.I.) e uma faixa dinâmica de 90. Na sequência, o ultrassonografista posicionava no centro da tela a placenta e a vasculatura da mesma e fixava manualmente o transdutor para mantê-lo imóvel, neste momento era administrado um bolus intravenoso de 0,01 mL/kg do meio de contraste (hexafluoreto de enxofre; SonoVue®, Bracco, São Paulo, Brasil), por meio de um cateter de 20 gauges colocado na veia cefálica de cada animal, após a injeção de contraste, era feita uma lavagem no cateter com 5ml com solução salina (NaCl 0,9%). No momento da aplicação considerado T0, iniciava-se a gravação em formato de vídeo das imagens resultantes, por um período de 120 segundos, para posterior análise, conforme descrito e validado (Waller et al., 2007; Dong et al., 2013; Choi et al., 2016; Gasser et al., 2020). Durante a própria gravação, o ultrassonografista realizava a avaliação qualitativa da imagem do contraste ultrassonográfico identificando: uniformidade do preenchimento nas regiões placentárias (homogêneo ou heterogêneo), áreas de hipoperfusão, e se ao longo do período gestacional o padrão de realce sofreria alguma alteração em relação à entrada e saída do contraste.

Após término das coletas, estes vídeos eram transferidos para um módulo de análise off-line (DICOM[®] Digital Imaging and Communications in Medicine, Rosslyn, VA, EUA), no qual dois avaliadores treinados e às cegas para o tempo de gestação definiam inicialmente áreas de interesse, incluindo a maior porção da área de placentação, nestas áreas eram definidas posteriormente cinco sub-regiões de interesse (ROI) de aproximadamente 1 mm² cada uma (Figura 1) evitando incluir grandes vasos sanguíneos identificados pelas cores esverdeadas na imagem. Definidas as ROI's, o software de processamento monta curvas de tempo-intensidade do contraste (TIC) e calcula automaticamente os parâmetros de perfusão: pico de intensidade do contraste (Peak em % de pixels), tempo para o pico (Tpeak em s), tempo médio de transmissão (TmT em s), área sob a curva (AUC) e número médio de pixels (Pixels) (Figura 2).

Análise Estatística

Os resultados foram analisados com ajuda do software R versão 3.3.0 (*R Foundation for Statistical Computing*, Áustria). A normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Após a comprovação dos supostos matemáticos, as variáveis coletadas de cada estrutura foram analisadas (medidas do modo B em triplicata, os resultados das três ondas analisadas no modo Doppler e as cinco ROI's da CEUS) pelo teste de ANOVA e a diferença entre as mesmas estimada pelo teste de Bland-Altman; de forma similar foram comparados os resultados obtidos nos dois fetos avaliados pelo teste T-Student e a diferença entre as mesmas estimada pelo teste de Bland-Altman. Uma vez comprovada a similaridade, observações e fetos foram calculadas e utilizadas para as análises posteriores as médias gerais de cada uma das variáveis estudadas. Subsequentemente estas variáveis foram comparadas entre os dias de gestação pela análise de variâncias (ANOVA) em um modelo inteiramente casualizado e pós-teste de Tukey. No caso

de serem coletados dados suficientes dos dias 25, 45 e 58 também foram correlacionadas com os dias de gestação pelo teste de Spearman. Os dados resultantes apresentam-se como a média +/- o desvio padrão (DP) e o cálculo do intervalo de confiança a 95% de significância da média. Identificadas anormalidades fetais/neonatais ao momento da avaliação M3/parto, os dados resultantes da avaliação destes fetos foram identificados como anormais e comparados com os dados dos fetos normais no momento M3 mediante teste Mann-Whitney; caso este teste resultasse significativo foi realizada análise de poder discriminativo para a identificação de anormalidades, mediante as curvas ROC, calculado o valor de coorte (VC), sensibilidade, especificidade, valor preditor positivo (VPP), valor preditor negativo (VPN) e acurácia, utilizando o modelo de regressão logística.

A significância foi fixada em 95% ($P < 0,05$) para todos os testes. Em relação aos fetos com anormalidades, os valores foram dispostos em tabelas em médias e desvio padrão e os achados qualitativos descritos. Devido ao número limitado de anormalidades, os resultados foram comparados descritivamente com os achados de normalidade obtidos.

Resultados

A avaliação ultrassonográfica em modo B, Doppler e CEUS mostrou-se de fácil aplicação a rotina e o uso do contraste aparentemente não ocasionou nenhuma intercorrência ou efeitos colaterais detectáveis à avaliação clínica das fêmeas e neonatos, ocorrendo os partos por meio de cirurgia cesariana eletiva. Dos 30 animais incluídos neste estudo 22 apresentaram processos gestacionais normais, desenvolvimento gestacional adequado e sem anormalidades evidentes nos indivíduos e nem nas placentas; resultando em 108 filhotes saudáveis, dos quais 44 foram avaliados neste estudo. Oito das 30 cadelas avaliadas apresentaram anormalidades fetais: seis fêmeas com fetos apresentando anasarca e duas com indivíduos com hidrocefalia.

Nos fetos identificados com anasarca foi possível detectar aos 58 dias de gestação espessamento da região subcutânea e acúmulo de conteúdo anecogênico nessa região. Nos indivíduos com hidrocefalia, verificou-se ventriculomegalia com acúmulo de conteúdo anecoico nos ventrículos, além da retração e hiperecogenicidade do tecido cerebral.

Todas as variáveis estudadas resultaram similares quando comparados: avaliador, observação e fetos com viés limitados, permitindo o uso de médias gerais para as análises posteriores.

Gestação fisiológica

Em relação aos parâmetros determinados pela ultrassonografia modo B, o DA aumentou conforme o avanço da gestação, sendo que no M1 foi de $1,13 \pm 0,34$ cm; no M2 de $2,66 \pm 0,38$ cm e no M3 de $3,72 \pm 0,45$ cm ($P < 0,0001$), já o DBP, aumentou ($P < 0,024$) do M1 ($0,76 \pm 0,25$ cm) para o M2 ($2,45 \pm 2,21$ cm) e manteve-se similar ($P > 0,05$) no M3 ($2,48 \pm 0,16$ cm). A frequência cardíaca fetal, foi similar ($P > 0,05$) nos momentos M1 (226 ± 14 bpm) e M2 (231 ± 10 bpm), diminuindo posteriormente ($P = 0,01$) no M3 (218 ± 17 bpm).

Os valores das variáveis avaliadas pela Dopplerfluxometria da artéria umbilical dos fetos estão representados na Tabela 1, sendo estas variáveis mensuráveis apenas nos momentos M2 e M3, a VS, VD, TaMax e TaMin aumentaram significativamente do M2 para o M3 ($P < 0,05$), enquanto o IP e o IR ($P < 0,05$) diminuíram.

Na Tabela 2 estão descritos os valores das variáveis Dopplerfluxométricas avaliadas antes e depois da aplicação do meio de contraste. Ao comparar estes dois momentos, não foram evidenciadas alterações significativas em M2 nem em M3 ($P > 0,05$), exceto para o IP que se mostrou maior após a administração do contraste ($P < 0,01$; Figura 3).

As variáveis avaliadas na CEUS permaneceram constantes durante todos os momentos, ou seja, não houve variação significativa nos valores de Peak, Tpeak, TmT, AUC em Pixels nos momentos M1, M2 e M3 ($P < 0,05$), como pode ser observado na Tabela 3. Qualitativamente, após a injeção do contraste, foi observado o realce das microbolhas logo após a fase de entrada pelos vasos uterinos (*wash-in*), com preenchimento da periferia para o centro da placenta (perfusão centrípeta), e subsequentemente com a fase de saída, ambas de maneira homogênea. Em todos os momentos de avaliação, independente do período gestacional, a distribuição do contraste foi homogênea na parede das vesículas embrionárias e tecido placentário, e não foi detectado nos embriões/fetos (Figura 4). Visualmente não foram observadas diferenças no padrão de realce em relação nos diferentes momentos avaliados, na área avaliada da placenta ou com relação à quantidade de fetos (Figura 5).

Anormalidades gestacionais

Na Tabela 4 está demonstrado o estudo comparativo das variáveis avaliadas no M3 em fetos de gestações fisiológicas ($n = 44$) e de fetos em que foram detectadas anormalidades, próximo ao parto, hidrocefalia e anasarca ($n = 8$). Em fetos com anormalidades, o preenchimento de contraste na placenta se apresentou heterogêneo e com menor intensidade de realce aparente, indicando falha na perfusão tecidual e consequentemente disfunção placentária. Nenhuma das variáveis quantitativas avaliadas pelos modos B e Doppler apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os fetos normais ou com anormalidades; porém, ao CEUS o Tpeak, o TmT e a AUC foram maiores ($P < 0,05$) nos fetos com anormalidades quando comparado aos normais e o Peak e os Pixels resultaram similares ($P > 0,05$). Desta forma um Tpeak $> 14,2s$ (VC) indica anormalidades fetais (anasarca ou hidrocefalia) com sensibilidade de 83,3%, especificidade de 71,4%, VPP de 45,5%, VPN 93,8% e acurácia de 74,1%. Um TmT

> 35,8s (VC) indica anormalidades fetais (anasarca ou hidrocefalia) com sensibilidade de 83,3%, especificidade de 66,7%, VPP de 41,7%, VPN de 93,3% e acurácia de 70,4%. Uma AUC > 1099 indica anormalidades fetais (anasarca ou hidrocefalia) com sensibilidade de 83,3%, especificidade de 75,0%, VPP de 55,6%, VPN de 92,3% e acurácia de 77,3%.

Discussão

O presente estudo demonstrou ser possível avaliar a perfusão placentária e o fluxo sanguíneo do cordão umbilical em 44 fetos saudáveis e oito fetos com anormalidades em cadelas braquicefálicas, fornecendo informações específicas para este grupo de animais, que apresentam uma elevada taxa de complicações gestacionais que afetam a vascularização placentária na gestação (Feliciano et al., 2019). Até o momento, há somente um estudo utilizando CEUS para avaliação da placenta em cadelas com gestação fisiológica de diferentes raças, porém sem avaliação da gestação a termo ou estudo de anormalidades (Orlandi et al., 2019), indicando que o presente estudo traz informações importantes sobre a hemodinâmica de todo processo gestacional, com o intuito de padronizar valores em cadelas braquicefálicas saudáveis e avaliar a acurácia diagnóstica da ultrassonografia Doppler e contrastada na identificação de anormalidades fetais, de possível origem hemodinâmico como a anasarca e a hidrocefalia.

Uma placenta normal e funcional é indispensável para que a gestação chegue até o final e se obtenham conceitos saudáveis e com desenvolvimento adequado (Kovo et al., 2013). Dessa forma, a avaliação de todas as fases da gestação é importante para o estudo da adaptação vascular embrionária, fetal e placentária nos animais. No presente estudo as avaliações contemplaram três momentos da gestação (25, 45 e 58 dias), sendo possível correlacionar os

aspectos hemodinâmicos avaliados com o desenvolvimento gestacional normal do binômio materno-fetal.

A padronização racial foi também importante para definir valores normais e específicos para determinado grupo de animais, uma vez que estudos com Doppler indicam que o peso do animal influencia no fluxo sanguíneo, tem sido encontrados valores diferentes dos vasos uterinos e umbilicais em gestação de cadelas com diferentes pesos (Blanco et al., 2020; Gaikwad et al., 2020), variação que pode ocorrer também em avaliações com a técnica de CEUS. A escolha deste tipo de animais também se deve pelo fato das fêmeas braquicefálicas serem mais propensas ao acometimento de anormalidades gestacionais (Feliciano e Assis 2019), o que torna uma avaliação hemodinâmica completa fundamental para a identificação acurada de possíveis alterações e para o acompanhamento pré-natal nestas gestantes.

Devido à importância que a CEUS pode vir a apresentar na avaliação obstétrica do estado funcional da placenta (Poret-Bazin et al., 2013) , cabe ressaltar que este foi mais um estudo no qual não foram observados efeitos adversos para mães e fetos, com estes últimos se desenvolvendo normalmente, apresentando frequências cardíacas e medidas biométricas adequadas para a espécie (Feliciano et al., 2015; Gianicco et al., 2016), sem alterações de valor clínico na hemodinâmica gestacional avaliada pelo Doppler e com nascimento a termo e saudáveis. Adicionalmente, o CEUS tem sido considerado método seguro para avaliação da perfusão sanguínea útero-placentária, pois as microbolhas não atravessam a placenta, ou seja, não há realce na estrutura embrionária ou fetal, assim como observado no presente estudo, não sendo capazes de causar efeitos adversos para os fetos (Mutotsuki, 2007; Roberts et al., 2016; Freccero et al., 2017; Orlandi et al., 2019). O uso do contraste se mostrou seguro mesmo no início da gestação, período crítico de desenvolvimento fetal, corroborando com os estudos de Keator et al. (2011) e Orlandi et al. (2019), que avaliaram placentas de primatas e cadelas,

respectivamente, por meio do CEUS no início da gestação e não observaram quaisquer tipos de danos a mãe ou os fetos.

A análise da forma da onda Dopplerfluxométrica da artéria umbilical, tem sido cada vez mais usada na avaliação do bem-estar fetal, sendo capaz de detectar velocidades de fluxo e índices vasculares nas diferentes ramificações das circulações uterina e fetal (Jaffe et al., 1997), além de ser recomendada como ferramenta diagnóstica para monitorar gravidez de alto risco em cadelas após 40 dias de gestação (Gaikwad et al., 2020). Em nosso estudo, a avaliação do cordão umbilical foi possível somente a partir dos 45 dias de gestação, como descrito por Johnston et al. (2001), quem descrevem que a detecção do cordão umbilical é possível pela ultrassonografia somente após os 40 dias de gestação. Nesta análise dopplerfluxométrica do cordão umbilical, foi verificado aumento significativo do fluxo sanguíneo do M2 para M3 com diminuição do IR e IP. Blanco et al. (2020) observaram semelhantes alterações de fluxo sanguíneo e resistência vascular na artéria uterina de cadelas saudáveis a partir de 40 dias até o final da gestação. Outros estudos em cadelas também encontraram aumento linear de fluxo sanguíneo e diminuição do IR e IP conforme o avanço da gestação (Nautrup, 1998, Di Salvo et al., 2006; Gaikwad et al., 2020). De fato, a circulação apresenta várias mudanças adaptativas ao longo da gestação, sendo o aumento do volume sanguíneo o mais impactante, e que acompanha a progressão da gestação (Poston et al., 1995). Consequentemente, acredita-se que a diminuição da resistência vascular auxilia para o aumento do fluxo sanguíneo placentário indispensável para o desenvolvimento fetal (Rennie et al., 2007; Yadav et al., 2016), sendo que, a remodelação anormal das artérias espirais no leito placentário leva à redução do suprimento sanguíneo para a placenta e é uma das características observadas em condições obstétricas, como pré-eclâmpsia e restrição de crescimento fetal (Brosens et al., 1972; Yagel et al., 1999).

Os índices de pulsatilidade da artéria umbilical sugerem que as mudanças adaptativas para aumentar o fluxo sanguíneo feto-placentário não ocorreram no primeiro terço da gestação em humanos (den Ouden et al., 1990). A partir do segundo terço, a diminuição da resistência vascular se reflete na análise da forma de onda umbilical (McParland e Pearce, 1988) com uma diminuição progressiva da resistência ao longo do tempo. Para manter o fluxo sanguíneo uteroplacentário, em circunstâncias normais, Trudinger (1991) observou que estudos avaliando o IP da artéria umbilical sugerem que a obliteração de 50% dos vasos placentários terminais deve ocorrer antes que a circulação seja comprometida.

Comparando os valores dopplerfluxométricos antes e após o uso do CEUS, verificou-se que não houve modificações de valor clínico nas variáveis Dopplerfluxométricas, entretanto foi possível notar um aumento de realce após o uso do contraste. Em concordância com nossos achados, o aumento do sinal Doppler foi semelhante ao descrito em primatas, equinos, ratos, mulheres e cadelas (Hua et al., 2009; Keator et al. 2011; Poret-Bazin et al., 2013; Freccero et al., 2017; Orlandi et al., 2019). A técnica CEUS, na veterinária, tem sido utilizada por aumentar o realce na perfusão e vascularização de diferentes órgãos além da placenta, sendo também descrita em fígado, baço, linfonodos, pâncreas, vesícula biliar e glândulas adrenais, permitindo identificar pequenas lesões com uma precisão muito melhor que com o uso da ultrassonografia convencional (Cosgrove, 2003).

Os parâmetros quantitativos avaliados no CEUS da placenta das cadelas braquicefálicas permaneceram constantes durante toda gestação, ou seja, a perfusão placentária manteve-se constante, apesar do aumento significativo do fluxo sanguíneo umbilical. Orlandi et al. (2019) também observaram manutenção dos valores quantitativos do CEUS na placenta proximal e distal de cadelas aos 23, 30 e 45 dias de gestação. Como já descrito, os índices de resistência das artérias uteroplacentárias e umbilicais diminuem progressivamente ao longo da gestação

em cadelas saudáveis, implicando em uma perfusão adequada da placenta e vísceras fetais (Gaikwad et al., 2020). Em fetos ovinos, foi observado que com o avanço da gestação, há um aumento absoluto do fluxo sanguíneo, podendo haver uma diminuição relativa na resistência periférica em outras partes do feto e a criação de novos canais vasculares na placenta (Rudolph e Heymann, 1970; Trudinger, 1987). O estabelecimento de uma circulação de alto fluxo e baixa resistência em ambos os lados da placenta é principalmente um resultado do aumento da seção transversal dos vasos devido à angiogênese vilosa no lado fetal e remodelamento das artérias espirais e vasodilatação no lado materno (Flo et al., 2010). Essa constância pode ser explicada pela adaptação da rede vascular placentária em cadelas visando manutenção da perfusão sanguínea adequada para o desenvolvimento fetal (Desai et al., 2004; Blanco et al., 2011) e pode ser um método compensatório, de forma semelhante ao que ocorre em humanos para prevenir alterações na pressão em gestações saudáveis (Valiance et al., 1989; Blanco et al., 2011; 2012).

Conforme a gestação progride, a plasticidade na placenta em desenvolvimento permite adaptações vasculares para atender às demandas de crescimento fetal e as crescentes demandas metabólicas do feto por meio de alterações estruturais, morfológicas e funcionais dependentes da gestação (Roberts et al., 2016; Yadav et al., 2016; Kowalewski et al., 2020). A rede vascular da placenta sofre remodelação extensa e contínua durante a gravidez. A angiogênese subsequente é, portanto, de importância fundamental no desenvolvimento da placenta e é imperativo que seja devidamente regulada. Caso isso não ocorra, pode haver restrição do crescimento fetal intrauterino e resultados obstétricos insatisfatórios (Burton et al., 2009). Além disso, o equilíbrio entre as circulações umbilical fetal e da placenta uterina materna é importante para a transferência de oxigênio através da placenta.

Além disso, as paredes capilares da placenta têm propriedades elásticas, visto que os sinusóides capilares são capazes de expansão/compressão dependendo do diferencial de pressão entre as circulações materna e fetal (Karimu e Burton, 1994). O diferencial de pressão tende a aumentar durante a gestação a medida que o coração fetal amadurece e, portanto, pode-se imaginar uma força de distensão continuamente crescente sendo aplicada (Burton et al., 2009). A importância em se avaliar a função placentária, faz da CEUS uma ferramenta que pode ser utilizada, para além de visualizar, quantificar a perfusão placentária em diferentes espécies, pois pode fornecer informações que auxiliam na identificação de alterações do fluxo sanguíneo (Roberts et al., 2016). Portanto, a avaliação da perfusão sanguínea da placenta é um dos indicadores centrais da função placentária e a descrição de um padrão de perfusão placentária em gestação saudável por meio do CEUS permite auxiliar na identificação precoce de anormalidades, o que ainda não é encontrado na literatura médica veterinária.

Qualitativamente, foi possível evidenciar a perfusão placentária homogênea já desde a primeira avaliação aos 25 dias, nas vesículas embrionárias e tecido placentário, até o último momento aos 58 dias, sem diferenças no padrão de realce. De forma semelhante, Orlandi et al. (2019), utilizando a mesma técnica, também encontraram padrão de perfusão homogêneo do contraste na placenta nos dois primeiros terços da gestação em cadelas saudáveis. A placenta canina começa exibir ramos de vasos sanguíneos do cordão umbilical que irrigam tanto o saco vitelínico quanto a cintura placentária entre os dias 25-30 de gestação (Miglino et al., 2006). Em nosso estudo, demos continuidade nas avaliações durante a gestação e verificar a manutenção dessa perfusão placentária homogênea até o final da gestação de cadelas. Em equinos também foi verificado padrão homogêneo de perfusão placentária (Freccero et al., 2017), entretanto, em humanos, os dados revelaram diferenças regionais na perfusão do espaço intervilloso dentro de uma placenta individual (Roberts et al., 2016). As diferenças estruturais

existentes entre as placentas, principalmente entre a endoteliocorial e zonária anular canina e a hemocorial e discoidal humana, são responsáveis pelas diferenças observadas.

No início da gestação obtivemos imagens de toda a placenta em um campo de visão (Figura 3), o que se tornou inviável posteriormente, sendo possível visibilizar somente parte da placenta. O mesmo ocorreu em outro estudo em cadelas, sendo possível avaliar toda a placenta aos 25 dias e não mais no decorrer da gestação (Orlandi et al., 2019). Tal limitação também foi relatada nos demais estudos da placenta com CEUS ao longo da gestação com outras espécies avaliadas (roedores - Arthuis et al., 2013; humanos e primatas - Roberts et al., 2016; equínos - Freccero et al., 2017), nos quais só foi possível obter a imagem placentária completa ou maior área no início da gestação.

A semelhança nos valores obtidos pela dopplerfluxometria da artéria umbilical dos fetos caninos normais e anormais também foi descrita (Freitas et al., 2016), demonstrando que em casos de hidropsia talvez não ocorra modificações na vascularização umbilical. Todavia, quando se avalia a vascularização placentária, Freitas et al. (2016) verificaram aumento do IR (3ª semana) e do IP (6ª semana) nas artérias uteroplacentárias dos fetos anormalidades congênicas (entre eles, três com hidropsia).

Este aumento da resistência vascular, está diretamente relacionado com a disfunção placentária (falha de preenchimento de contraste) observada em nosso estudo ao se utilizar a ultrassonografia contrastada, sendo resultado de um desenvolvimento vascular limitado e de uma invasão trofoblástica incompleta no leito placentário (Reynolds et al., 2006). Possivelmente, a realização de avaliações em momentos anteriores dos fetos braquicefálicos anormais, poderia ter detectado precocemente o processo de disfunção placentária pelo CEUS.

Em casos de hidropsia, a placenta geralmente apresenta-se edemaciada e com maturação tecidual tardia na histopatologia (Parks, 2015), justificando os achados descritos no presente

estudo em fetos com anasarca e hidrocefalia, visto que a maturação tardia ou a falha no desenvolvimento placentário parece estar relacionada diretamente com o atraso de preenchimento de contraste verificado nos valores obtidos pela CEUS nos fetos caninos com estas anormalidades, e a falha na perfusão placentária.

Salienta-se que foram avaliados poucos fetos caninos anormais (oito indivíduos) e tipos de alterações gestacionais (anasarca e hidrocefalia) no presente estudo, fatos que poderiam ser considerados como limitações do trabalho. Porém, os resultados são extremamente promissores em relação ao uso da CEUS, demonstrando segurança na aplicação desta técnica em indivíduos com gestação anormal, indicando grandes possibilidades para uso experimental (com pesquisas utilizando um número maior de fetos anormais, momentos gestacionais diferentes, diversos tipos de anormalidades e avaliação histopatológica dos tecidos placentários) e aplicabilidade na rotina obstétrica para detecção de processos gestacionais com risco de disfunção placentária em fêmeas caninas e outras espécies, possibilitando futuras intervenções para manutenção adequada da gestação .

A associação das técnicas dopplerfluxométrica e CEUS permitiu estabelecer parâmetros qualitativos e quantitativos da hemodinâmica gestacional, em três momentos da gestação, de cadelas braquicefálicas saudáveis. Foi possível acompanhar as adaptações vasculares materno-fetais conforme a progressão da gestação, determinando a dinâmica vascular da artéria umbilical dos fetos pelo Doppler, com diminuição dos índices de pulsatilidade e resistência no terço final; além de observar as características quali-quantitativas da perfusão placentária por meio do CEUS, que se mostraram constantes e homogêneas durante os períodos avaliados, sendo possível correlacionar com desenvolvimento e manutenção de todo processo gestacional em cadelas saudáveis. Finalmente a CEUS permitiu detectar a disfunção placentária nas fêmeas com fetos anormais, com fetos apresentando anasarca e hidrocefalia, verificada pela

heterogenicidade na perfusão tecidual, menor intensidade de preenchimento do tecido placentário e atraso nos tempos de perfusão, com acurácia diagnóstica próxima de 75%.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos tutores por terem permitido a inclusão e avaliação dos seus animais, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (protocolo FAPESP números: 2017/14957-6 e 2019/15282-8) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de pesquisa, bolsa produtividade (processos 430023/2018-9 e 309199/2017-4) e bolsa de doutorado (processo 160348/2018-8).

Contribuição dos autores

P Silva e MC Maronezi contribuíram para este trabalho e analisaram os dados de imagem. B Gasser, L Pavan, MC Maronezi realizaram igualmente os procedimentos experimentais. LP Aires ajudou em parte das avaliações. P Silva, LCP Nakaghi, RRA Uscategui e MAR Feliciano planejaram os experimentos, analisaram os dados e escreveram o manuscrito. Todos os autores revisaram o manuscrito.

Conflito de interesses

Os autores informam que não há conflitos de interesse. Os autores são os únicos responsáveis pelo conteúdo e redação do artigo.

Referências

- Almeida VT, Uscategui RAR, Silva PDA, Avante ML, Simões APR, Vicente WRR. Hemodynamic gestational adaptation in bitches. *Cienc Rural* 2017; 47:1-7.
- Arthuis CJ, Novell A, Escoffre JM, Patat F, Bouakaz A, Perrotin F. New insights into uteroplacental perfusion: quantitative analysis using Doppler and contrast-enhanced ultrasound imaging. *Placenta* 2013; 34:424-431.
- Bargellini P, Orlandi R, Paloni C, Rubini G, Fonti P, Righi C, Peterson ME, Rishniw M, Boiti C. Contrast-enhanced ultrasound complements twodimensional ultrasonography in diagnosing gallbladder diseases in dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 2018; 59:345-356.
- Blanco PG, Arias D, Rube A, Barrena JP, Corrada Y, Gobello C. An experimental model to study resistance index and systolic/diastolic ratio of uterine arteries in adverse canine pregnancy outcome *Reprod Domest Anim* 2009; 44: 164-166.
- Blanco PG, Batista PR, Re NE, Mattioli GA, Arias DO, Gobello C. Electrocardiographic changes in normal and abnormal canine pregnancy. *Reprod Domest Anim*. 2012; 47:252-256.
- Blanco PG, Huk M, Lapuente C, Tórtora M, Rodríguez R, Arias DO, Gobello C. Uterine and umbilical resistance index and fetal heart rate in pregnant bitches of different body weight. *Anim Reprod Sci*. 2020; 212:106255.
- Blanco PG, Rodríguez R, Rube A, Arias DO, Tórtora M, Díaz JD, Gobello C. Doppler ultrasonographic assessment of maternal and fetal blood flow in abnormal canine pregnancy. *Anim Reprod Sci*. 2011;126:130-135.
- Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu*. 1972; 1:177-191.
- Burton GJ, Charnock-Jones DS, Jauniaux E. Regulation of vascular growth and function in the human placenta. *Reproduction* 2009; 138:895-902.
- Choi SY, Jeong WC, Lee YW, Choi HJ. Contrast enhanced ultrasonography of kidney in conscious and anesthetized beagle dogs. *J. Vet. Sci*. 2016; 78:239–244.
- Cosgrove D. Angiogenesis imaging--ultrasound. *Br J Radiol*. 2003;76:S43–S49.
- Cosgrove D. Ultrasound contrast agents: an overview. *Eur J Radiol* 2006; 60:324-30.
- Den Ouden M, Cohen-Overbeek TE, Wladimiroff JW. Uterine and fetal umbilical artery flow velocity waveforms in normal first trimester pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*. 1990; 97:716-719.
- Desai MY, Lima JA, Bluemke DA. Cardiovascular magnetic resonance imaging: current applications and future directions. *Methods Enzymol*. 2004;386:122-48.
- Di Salvo P, Bocci F, Zelli R, Polisca A. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in the bitch *Res Vet Sci* 2006; 81:382-388.
- Divon MY, Ferber A. Umbilical artery Doppler velocimetry--an update. *Semin Perinatol* 2001; 25:44-47.
- Dong Y, Wang W, Cao J, Fan P, Lin X. Quantitative Evaluation of Contrast-Enhanced Ultrasonography in the Diagnosis of Chronic Ischemic Renal Disease in a Dog Model. *PLoS ONE* 2013; 8:1–7.

- Farrow CS. Ultra talk: beginners guide to the language of ultrasound, *Vet Radiol Ultrasound* 1992; 33:31-32.
- Feliciano MAR, Assis AR, Vicente WRR. Ultrassonografia em cães e gatos. Editora MedVet; 45, 2019.
- Feliciano MAR., Maciel GS, Coutinho LN, Almeida VT, Uscategui RR, Vicente WRR. Gestational Echo Biometry in Brachycephalic Pregnant Bitches. *Ci Anim Bras* 2015; 16:419–427.
- Flo K, Wilsgaard T, Acharya G. Relation between utero-placental and feto-placental circulations: a longitudinal study. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010 ;89:1270-1275.
- Freccero F, Toaldo MB, Castagnetti C, Cipone M, Diana A. Contrast-enhanced ultrasonography (CEUS) of the uterus during normal equine pregnancy: preliminary report in two mares. *J Equine Vet Sci* 2017; 54:42e9.
- Freitas LA, Mota GL, Silva HVR, Carvalho CF, Silva LDM. Can maternal-fetal hemodynamics influence prenatal development in dogs? *Anim Reprod Sci* 2016; 172: 83–93.
- Gaikwad SM, Gulavane SU, Kumbhar UB, Shelar RR, Chaudhari RJ, Ribeiro RA. Doppler evaluation of maternal vessels in normal gestation and threatened abortion in canines. *Ir. Vet. J.* 2020; 1; 73:15.
- Gasser B, Uscategui RAR, Maronezi MC, Pavan L, Simões APR, Martinato F, Silva P, Crivellenti LZ, Feliciano MAR. Clinical and ultrasound variables for early diagnosis of septic acute kidney injury in bitches with pyometra. *Sci Rep.* 2020; 10:8994.
- Giannico AT, Garcia DA, Gil EM, Sousa MG, Froes TR. Assessment of umbilical artery flow and fetal heart rate to predict delivery time in bitches. *Theriogenology* 2016; 86:1654-1661.
- Gloria A, Contri A, Carluccio A, Robbe D. Blood periovulatory progesterone quantification using different techniques in the dog. *Anim Reprod Sci* 2018; 192:179-184.
- Harman CR, Baschat AA. Comprehensive assessment of fetal wellbeing: which Doppler tests should be performed? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003; 15:147-157.
- Hirsch AJ, Roberts VHJ, Grigsby PL, Haese N, Schabel MC, Wang X, Lo JO, Liu Z, Kroenke CD, Smith JL, Kelleher M, Broeckel R, Kreklywich CN, Parkins CJ, Denton M, Smith P, Filippis V, Messer W, Nelson JA, Hennebold JD, Grafe M, Colgin L, Lewis A, Ducore R, Swanson T, Legasse AW, Axthelm MK, MacAllister R, Moses AV, Morgan TK, Frias AE, Streblow DN. Zika virus infection in pregnant rhesus macaques causes placental dysfunction and immunopathology. *Nat Commun* 2018; 9: 263.
- Hua X, Zhu LP, Li R, Zhong H, Xue YF, Chen ZH. Effects of diagnostic contrast-enhanced ultrasound on permeability of placental barrier: a primary study. *Placenta* 2009; 30:780-784.
- Jacomini JO, Cunha GN, Moreira CF. Use of the artificial insemination in Bulldogs bitches. *Vet Not* 2006; 12:141-144.
- Jaffe R, Jauniaux E, Hustin J. Maternal circulation in the first-trimester human placenta--myth or reality? *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 176:695-705.
- Johnston SD, Kustritz MV, Olson PS. Canine and feline pregnancy; 2001.
- Karimu AL, Burton GJ. The effects of maternal vascular pressure on the dimensions of the placental capillaries. *Br J Obstet Gynaecol.* 1994; 101:57-63.

- Keator CS, Lindner JR, Belcik JT, Bishop CV, Slayden OD. Contrast-enhanced ultrasound reveals real-time spatial changes in vascular perfusion during early implantation in the macaque uterus. *Fertil Steril*. 2011; 95:1316-1321.
- Kovo M, Schreiber L, Bar J. Placental vascular pathology as a mechanism of disease in pregnancy complications. *Thromb. Res*. 2013;1:S18-S21.
- Kowalewski MP, Tavares Pereira M, Kazemian A. Canine conceptus-maternal communication during maintenance and termination of pregnancy, including the role of species-specific decidualization. *Theriogenology* 2020; 50:329-338.
- Kuo K, Roberts VHJ, Gaffney J, Takahashi DL, Morgan T, Lo JO, Stouffer RL, Frias AE. Maternal high fat diet and chronic hyperandrogenemia are associated with placental dysfunction in female rhesus macaques. *Endocrinology* 2019; 160: 1937-1949.
- Landim Junior LP. Placenta e Placentação. In: Vicente WRR, Apparicio M (eds.) Reprodução e Obstetrícia em Cães e Gatos, 1st ed. São Paulo: MedVet; 2015:47-52.
- Lin S, Shimizu I, Suehara N, Nakayama M, Aono T. Uterine artery Doppler velocimetry in relation to trophoblast migration into the myometrium of the placental bed. *Obstet Gynecol* 1995; 85:760-765.
- Longo LD. Maternal blood volume and cardiac output during pregnancy: a hypothesis of endocrinologic control *Am J Physiol* 1983; 245:720-729.
- Lopate C. Estimation of gestational age and assessment of canine fetal maturation using radiology and ultrasonography: A review. *Theriogenology* 2008; 70: 397-402.
- Mattoon JS, Nyland TG. Small Animal Diagnostic Ultrasound, (Eds.) St Louis: Elsevier, 2015.
- McParland, P.; Pearce, J.M. Review article: Doppler blood flow in pregnancy. *Placenta* 1988; 9: 427-450.
- Miglino MA, Ambrósio CE, dos Santos Martins D, Wenceslau CV, Pfarrer C, Leiser R. The carnivore pregnancy: the development of the embryo and fetal membranes. *Theriogenology* 2006; 66:1699-1702.
- Mutotsuki, J. Contrast-enhanced ultrasound in obstetrics and gynecology. *Ultrasound Obstet. Gynecol* 2007; 1:16-19.
- Nautrup CP. Doppler ultrasonography of canine maternal and fetal arteries during normal gestation. *J Reprod Fertil* 1998; 112:301-314.
- Orlandi R, Vallesi E, Boiti C, Polisca A, Troisi A, Righi C, Bargellini P. Contrast-enhanced ultrasonography of maternal and fetal blood flows in pregnant bitches. *Theriogenology* 2019; 125:129-134.
- Parks WT. A Pathologist's Approach to Nonimmune Hydrops. *J Fetal Med* 2015; 2: 143–149.
- Poret-Bazin H, Simon EG, Bleuzen A, Dujardin PA, Patat F, Perrotin F. Decrease of uteroplacental blood flow after feticide during second-trimester pregnancy termination with complete placenta previa: quantitative analysis using contrast-enhanced ultrasound imaging. *Placenta* 2013; 34:1113-1115
- Poston L, McCarthy AL, Ritter JM. Control of vascular resistance in the maternal and fetoplacental arterial beds. *Pharmacol Ther*. 1995;65:215-39.

- Rennie MY, Whiteley KJ, Kulandavelu S, Adamson SL, Sled JG. 3D visualisation and quantification by microcomputed tomography of late gestational changes in the arterial and venous feto-placental vasculature of the mouse. *Placenta* 2007; 28:833-40.
- Reynolds, LP, Caton JS, Redmer DA, Grazul-Bilska AT, Vonnahme KA, Borowicz PP, Luther JS, Wallace JM, Wu G, Spencer TE. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J Physiol* 2006; 572: 51–58.
- Roberts VH, Lo JO, Salati JA, Lewandowski KS, Lindner JR, Morgan TK, Frias AE. Quantitative assessment of placental perfusion by contrast-enhanced ultrasound in macaques and human subjects. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 214:369e1-8.
- Roberts VHJ, Frias AE. Contrast-enhanced ultrasound for the assessment of placental development and Function. *Biotechnol* 2020; 69:393-400.
- Roberts VHJ, Lo JO, Lewandowski HS, Blundell P, Grove KL, Kroenke CD, Sullivan EL, Roberts Jr ct, Frias AE. Adverse Placental Perfusion and Pregnancy Outcomes in a New Nonhuman Primate Model of Gestational Protein Restriction. *Reprod Sci* 2018; 25:110-119.
- Rudolph AM, Heymann MA. Circulatory changes during growth in the fetal lamb. *Circ Res.* 1970; 26:289-99.
- Salati JA, Roberts VHJ, Schabel MC, Lo JO, Kroenke CD, Lewandowski KS, Lindner JR, Grove LK, Frias AE. Maternal high-fat diet reversal improves placental hemodynamics in a nonhuman primate model of diet-induced obesity. *Int J Obes* 2019; 43; 906-916
- Simões APR, Feliciano MAR, Maronezi MC, Uscategui RAR, Bartlewski PM, Almeida VT, Oh D, Silva PES, Da Silva LCG, Vicente WRR. Elastographic and echotextural characteristics of foetal lungs and liver during the final 5 days of intrauterine development in dogs. *Anim Reprod Sci* 2018; 197:170-176.
- Socha P, Rudowska M, Janowski T. Effectiveness of determining the parturition date in bitches using the ultrasonographic fetometry as compared to hormonal and cytological methods *Pol J Vet Sci* 2012; 15:447-453.
- Tesi M, Miragliotta V, Scala L, Aronica E, Lazzarini G, Fanelli D, Abramo F, Rota A. Relationship between placental characteristics and puppies' birth weight in toy and small sized dog breeds. *Theriogenology* 2020; 141:1-8.
- Trudinger BJ, Giles WB. Clinical and pathologic correlations of umbilical and uterine artery waveforms. *Clin Obstet Gynecol.* 1989; 32:669-678.
- Trudinger BJ. Doppler ultrasound studies and fetal abnormality. In: Antenatal Diagnosis of Fetal Abnormalities. Drife JO and Donnai D. (eds) Springer Verlag, Berlin, pp. 113-125, 1991.
- Trudinger BJ. The umbilical circulation. *Semin Perinatol.* 1987;11:311-321.
- Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989; 334:997-1000.
- Waller KR, O'Brien RT, Zagzebski JÁ. Quantitative contrast ultrasound analysis of renal perfusion in normal dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 2007; 48:373–377.
- Yadav BK, Neelavalli J, Krishnamurthy U, Szalai G, Shen Y, Nayak NR, Chaiworapongsa T, Hernandez-Andrade E, Than NG, Haacke EM, Romero R. A longitudinal study of placental perfusion using dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging in murine pregnancy. *Placenta* 2016; 43:90-97.

Yagel S, Anteby EY, Shen O, Cohen SM, Friedman Z, Achiron R. Placental blood flow measured by simultaneous multigate spectral Doppler imaging in pregnancies complicated by placental vascular abnormalities. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1999; 14:262-266.

Yeager AE, Mohammed HO, Meyers-Wallen V, Vannerson L, Concannon, PW, Ultrasonographic appearance of the uterus, placenta, fetus, and fetal membranes throughout accurately timed pregnancy in beagles. *Am J Vet Res* 1992; 53:342-351.

Zhou YJ, Yuan ML, Li R, Zhu LP, Chen ZH. Real-time placental perfusion on contrast-enhanced ultrasound and parametric imaging analysis in rats at different gestation time and different portions of placenta. *PLoS One* 2013; 8:e58986.

Tabelas

Tabela 1. Média $\pm$ DP de variáveis quantitativas avaliadas no cordão umbilical pelo modo Doppler pulsado em 44 fetos em diferentes momentos da gestação de 22 cadelas braquicefálicas.

Variável	Momento (dias)	Media $\pm$ DP	P-valor	IC95%
VS (cm/s)	45	61,7 $\pm$ 20,3	0,0332*	53-71
	58	77,6 $\pm$ 26,9		66-90
VD (cm/s)	45	10,2 $\pm$ 4,28	0,0010*	8-12
	58	17,1 $\pm$ 8,21		14-21
TaMAX (cm/s)	45	27,9 $\pm$ 8,70	0,0142*	24-32
	58	36,7 $\pm$ 13,1		31-42
TaMIN (cm/s)	45	13,4 $\pm$ 4,59	0,0056*	11-15
	58	18,7 $\pm$ 6,84		16-22
IR	45	0,841 $\pm$ 0,41	0,0014*	0,82-0,86
	58	0,79 $\pm$ 0,34		0,78-0,81

cm/s: centímetros/segundos, DP: desvio padrão, VS: velocidade sistólica, VD: velocidade diastólica, TaMin: tempo médio da velocidade mínima, TaMax: tempo médio da velocidade máxima IP: índice de pulsatilidade, IR: índice de resistência vascular. *Considerado estatisticamente significativo pelo teste de t-Student, ($p \leq 0,05$).

Tabela 2. Média $\pm$ DP de variáveis quantitativas avaliadas no cordão umbilical pelo modo Doppler pulsado antes e após o uso do contraste microbolhas em 44 fetos, aos 45 e 58 dias de gestação, de 22 cadelas braquicefálicas.

Variável	Antes Média$\pm$DP	Após Média$\pm$DP	Viés	DP-Viés	P-value
VS (cm/s)	70,1 $\pm$ 25,3	73,0 $\pm$ 22,1	2,43	13,07	0,2297
VD (cm/s)	14,0 $\pm$ 7,31	13,4 $\pm$ 5,32	-0,84	5,39	0,3143
TaMAX (cm/s)	32,3 $\pm$ 12,0	33,1 $\pm$ 10,0	0,06	6,80	0,9575
TaMIN (cm/s)	16,2 $\pm$ 6,30	16,1 $\pm$ 5,21	0,02	3,55	0,9659
IP	1,83 $\pm$ 0,24	1,92 $\pm$ 0,31	0,11	0,28	0,0124*
IR	1,10 $\pm$ 1,80	0,83 $\pm$ 0,06	-0,01	0,05	0,1736

cm/s: centímetros/segundos, DP: desvio padrão, VS: velocidade sistólica, VD: velocidade diastólica, TaMin: tempo médio da velocidade mínima, TaMax: tempo médio da velocidade máxima IP: índice de pulsatilidade, IR: índice de resistência vascular. Viés: desvio sistemático do valor real *Considerado estatisticamente significativo pelo teste de t-Student, ($p \leq 0,05$).

Tabela 3. Média $\pm$ DP de variáveis quantitativas avaliadas pelo Software da ultrassonografia contrastada por microbolhas (CEUS) em 2 fetos de cada gestante em diferentes momentos da gestação de cadelas braquicefálicas (n).

Variável	Momento(dias)	N	Media $\pm$ DP	P-valor
Peak (%)	25	20	20,7 $\pm$ 6,97	0,3210
	45	18	21,7 $\pm$ 5,83	
	58	16	23,8 $\pm$ 5,64	
Tpeak (s)	25	20	17,0 $\pm$ 5,51	0,4622
	45	21	14,5 $\pm$ 5,13	
	58	21	15,1 $\pm$ 8,52	
TmT (s)	25	20	30,3 $\pm$ 9,46	0,7444
	45	21	32,9 $\pm$ 15,1	
	58	21	32,9 $\pm$ 11,9	
AUC (%)	25	20	813 $\pm$ 500	0,9276
	45	18	840 $\pm$ 416	
	58	16	872 $\pm$ 422	
Pixels	25	20	78,5 $\pm$ 24,8	0,7651
	45	18	72,2 $\pm$ 43,6	
	58	16	71,5 $\pm$ 23,5	

%, porcentagem, s: segundos, %s: porcentagem por segundos, DP: desvio padrão, F: feto, Fpeak: Pico de intensidade em pixels, Ftp: tempo para o pico de intensidade em segundos, Fmtt: tempo médio de transmissão, Fauc: área sob a curva, Fpixels: inclinação da curva de entrada em pixels.

Tabela 4. Mediana $\pm$ IQR (intervalo interquartil) das variáveis quantitativas avaliadas pelas técnicas ultrassonográficas Modo B, Doppler e contrastada por microbolhas (CEUS) em fetos resultantes de gestações livres de anormalidades (FN, n = 44) e nos fetos em que foram detectadas anormalidades (hidrocefalia e anasarca) próximo do parto (FA, n = 8), aos 58 dias de gestação (M3).

Variável	FN	FA	P-Valor
DA (cm)	3,76 $\pm$ 0,62	3,84 $\pm$ 2,36	0,5937
DBP (cm)	2,49 $\pm$ 0,58	2,69 $\pm$ 0,61	0,4399
FC (bpm)	216 $\pm$ 29,0	222 $\pm$ 93,0	0,9375
VS (cm/s)	83,4 $\pm$ 28,2	69,3 $\pm$ 39,4	0,2602
VD (cm/s)	16,1 $\pm$ 6,79	14,1 $\pm$ 4,47	0,1514
TaMAX (cm/s)	36,6 $\pm$ 15,8	32,4 $\pm$ 23,1	0,4168
TaMIN (cm/s)	18,1 $\pm$ 8,14	17,3 $\pm$ 11,8	0,3875
IP	1,80 $\pm$ 0,45	1,68 $\pm$ 0,29	0,2043
IR	0,80 $\pm$ 0,06	0,81 $\pm$ 0,08	0,9266
Peak (%)	23,9 $\pm$ 6,68	21,8 $\pm$ 10,2	0,7114
Tpeak (s)	13,1 $\pm$ 6,74	22,0 $\pm$ 25,8	0,0181*
TmT (s)	33,0 $\pm$ 14,9	40,6 $\pm$ 28,5	0,0488
AUC	783 $\pm$ 630	1236 $\pm$ 342	0,0113*
Pixels	72,0 $\pm$ 30,0	91,7 $\pm$ 37,8	0,0528

cm/s: centímetros/segundos, DP: desvio padrão, VS: velocidade sistólica, VD: velocidade diastólica, TaMin: tempo médio da velocidade mínima, TaMax: tempo médio da velocidade máxima IP: índice de pulsatilidade, IR: índice de resistência vascular. %: porcentagem, s: segundos, %s: porcentagem por segundos, DP: desvio padrão, F: feto, Fpeak: Pico de intensidade em pixels, Ftp: tempo para o pico de intensidade em segundos, Fmtt: tempo médio de transmissão, Fauc: área sob a curva, Fpixels: inclinação da curva de entrada em pixels. *Considerado estatisticamente significativo ($P \leq 0,05$).

Figuras

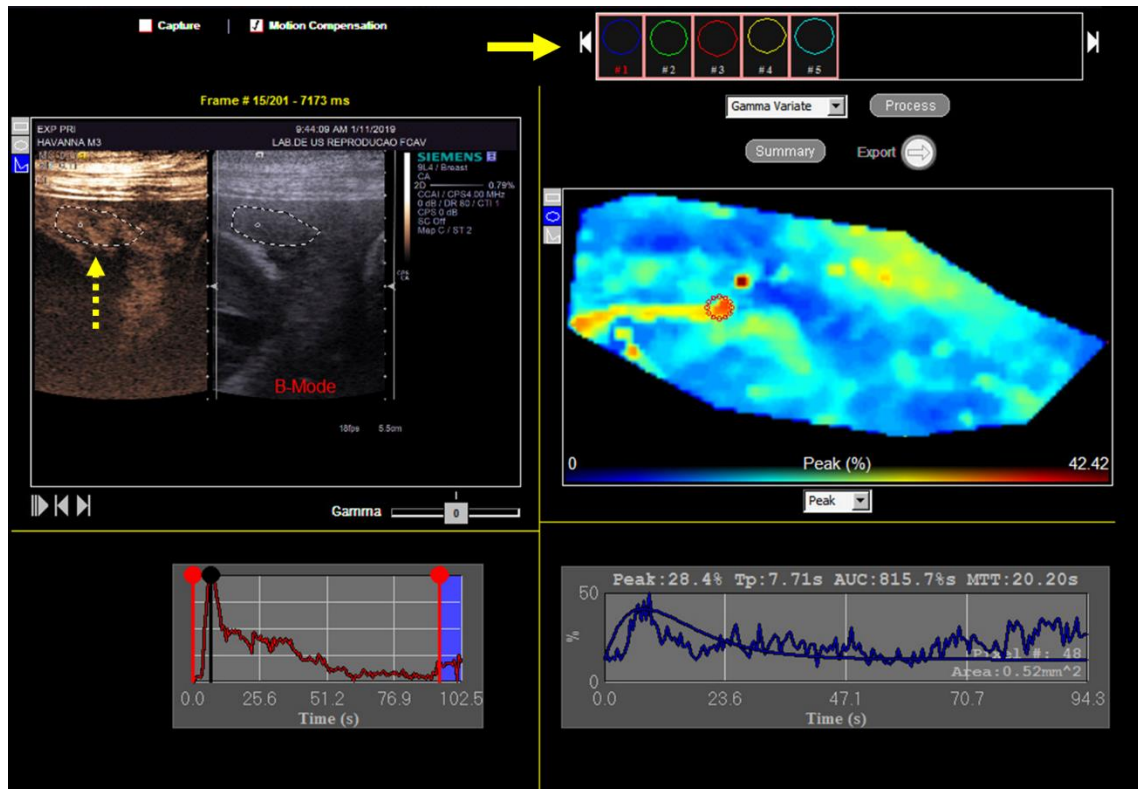


Figura 1. Imagem de exame CEUS em área placentária de cadela braquicefálica saudável, com avaliação quantitativa e determinação de ROIS (seta contínua) já selecionados na região de interesse da placenta (seta tracejada) no software CADENCE.

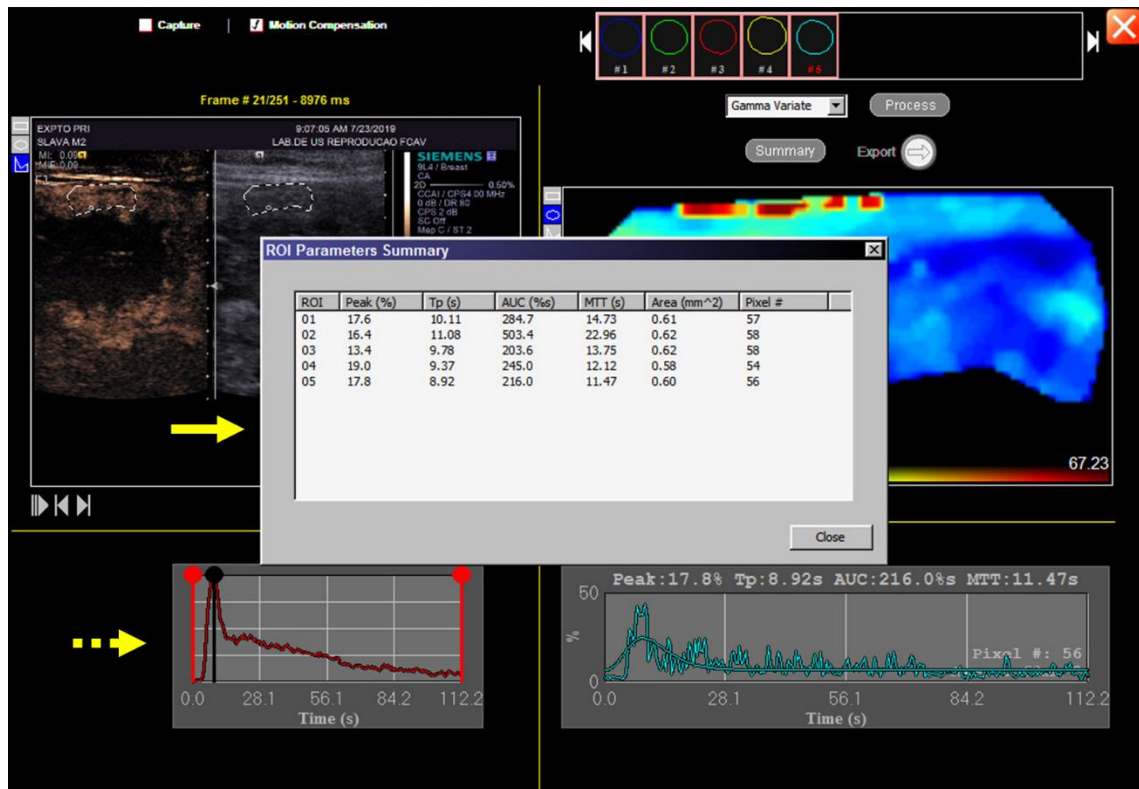


Figura 2. Imagem de exame CEUS em área placentária de cadela braquicefálica saudável, com avaliação quantitativa de dados obtidos pela microbolhas (seta contínua) gráfico representando a entrada (pico) e saída do contraste (seta tracejada) no software CADENCE.

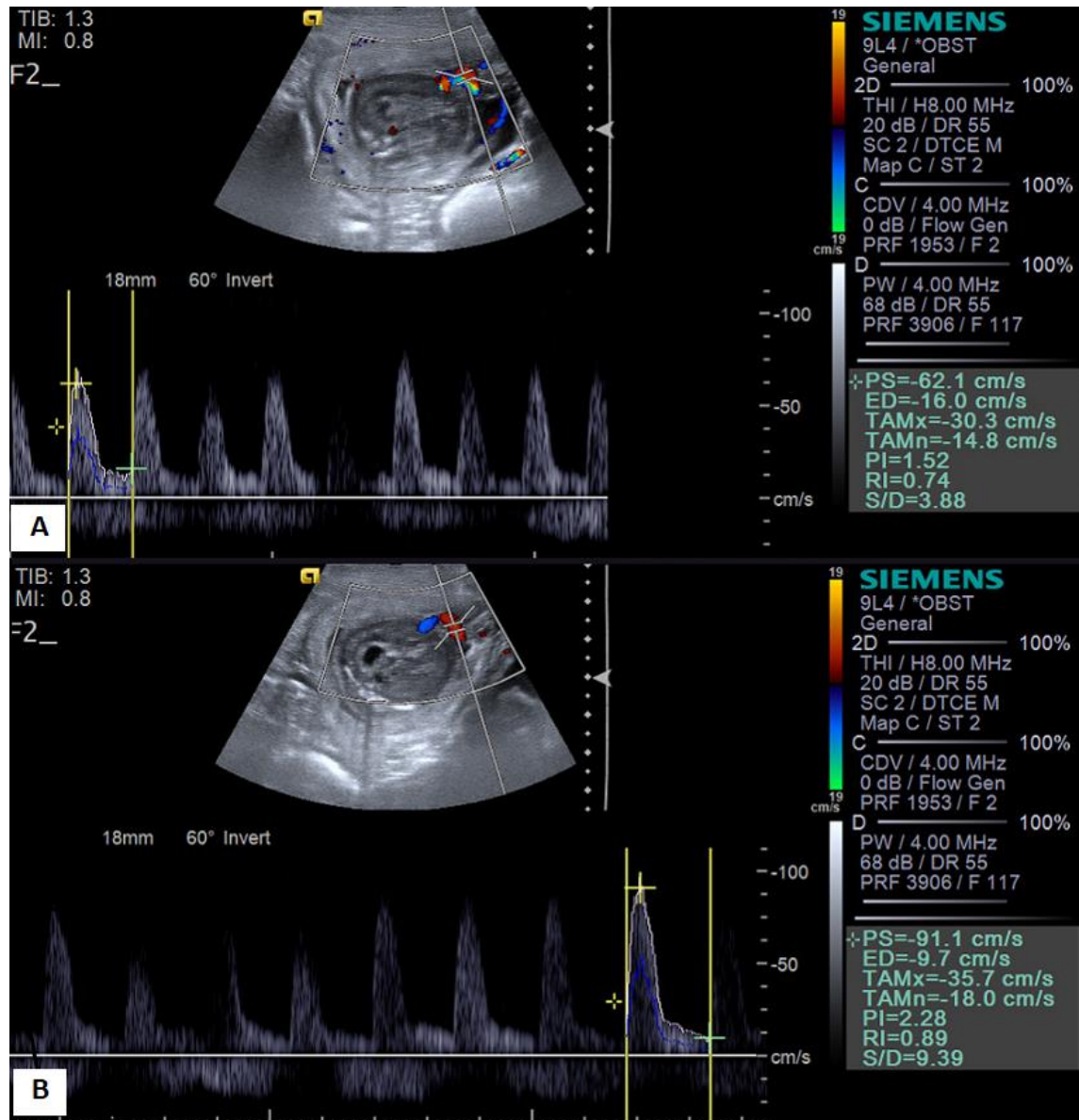


Figura 3. Imagem ultrassonográfica modo Doppler pulsado, mostrando os índices dopplerfluxometricos do cordão umbilical de feto aos 45 dias de gestação (M2) em cadela braquicefálica, (A) antes e (B) após o uso do contraste CEUS. É possível observar aumento do índice de pulsatividade (IP).

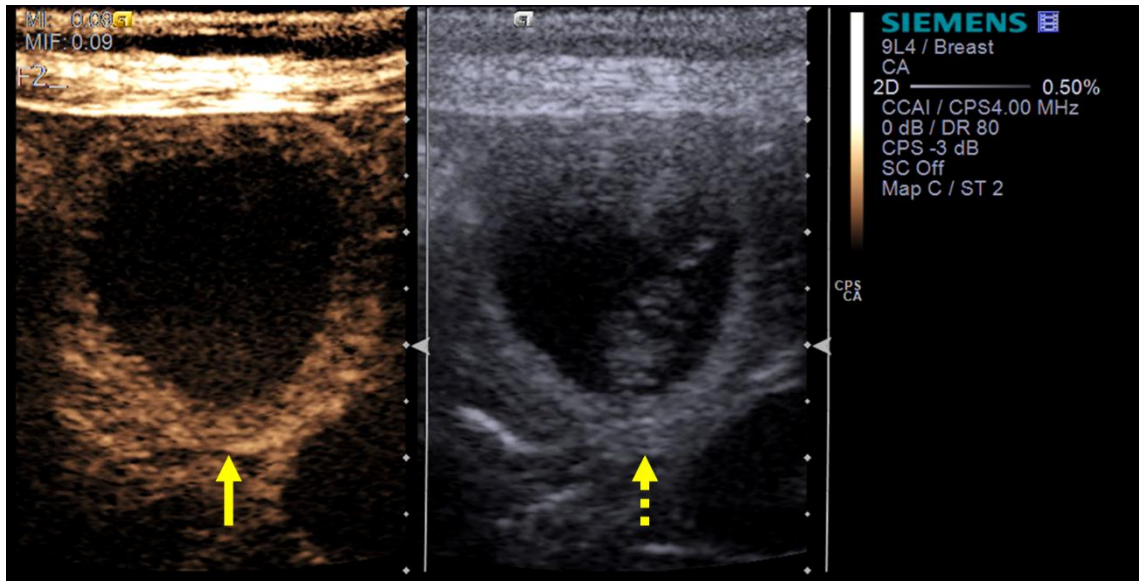


Figura 4. Imagem ultrassonográfica demonstrando a aplicação do contraste microbolhas em cadela braquicefálica com 25 dias de gestação, enquanto é possível visibilizar a maior área placentária (seta contínua) modo Cadence específico para execução da ultrassonografia contrastada por microbolhas (seta contínua) e modo B para facilitar a visualização da área avaliada (seta tracejada).

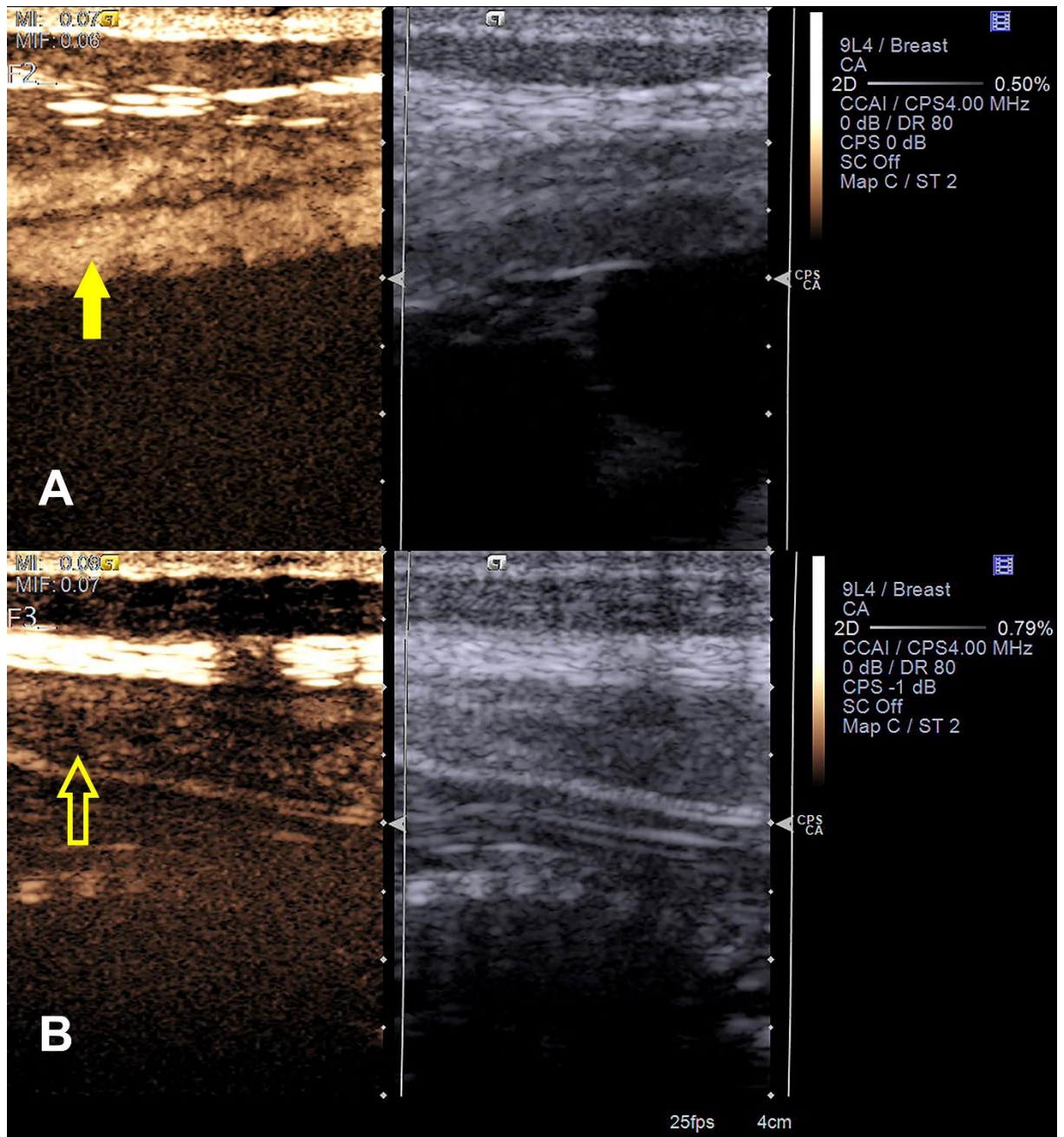


Figura 5. Imagem ultrassonográfica demonstrando o pico de realce do contraste microbolhas em região placentária (setas) de cadelas braquicefálicas em 58 dias de gestação. Em A, observa-se característica de preenchimento homogêneo e intenso do tecido placentário (seta preenchida) de feto sem alterações de desenvolvimento. Em B, nota-se preenchimento heterogêneo do tecido e com menor intensidade, com presença de áreas hipoeoicas (seta vazia) no parênquima placentário de feto com alterações de desenvolvimento.

CAPÍTULO 3 – RELATO DE CASO: Detecção ultrassonográfica de nefrite intersticial em feto canino²

Priscila Silva¹, Marjury Cristina Maronezi¹, Beatriz Gasser¹, Letícia Pavan¹, Luiz Paulo Nogueira Aires¹, Luciana Cristina Padilha-Nakaghi¹, Ricardo Andrés Ramirez Uscategui³ & Marcus Antônio Rossi Feliciano^{1,2}

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Jaboticabal, SP, Brasil. ²Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. ³Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Unaí, MG, Brasil. Autor Correspondente: P. Silva [priscilasvet@gmail.com]. Departamento de Patobiologia e Teriogenologia Veterinária, UNESP - FCAV. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n. CEP 14884-900 Jaboticabal, SP, Brazil.

ABSTRACT

Introdução: Um exame de ultrassom detalhado do trato urinário fetal como parte do cuidado pré-natal é importante para detectar possíveis anormalidades. O diagnóstico precoce pode prevenir danos mais sérios, como perda da função renal. A nefrite intersticial pode comprometer a funcionalidade renal. Além disso, a nefrite intersticial aguda é uma causa frequente de lesão renal aguda e pode se tornar crônica se não for tratada. Além disso, a biópsia renal pode auxiliar no diagnóstico e estadiamento da doença. Portanto, este relato tem como objetivo descrever os achados ultrassonográficos dos tecidos renais em um feto canino com nefrite intersticial.

Caso: As avaliações ultrassonográficas gestacionais foram realizadas em uma mulher Pug, com 25, 45 e 58 dias de gestação. O exame ultrassonográfico foi realizado com transdutor linear de 9,0 MHz e transdutor digital de alta resolução com frequência padronizada em 17,0 MHz. Na primeira avaliação, vesículas embrionárias foram detectadas e compatíveis com o período gestacional. Aos 45 dias de gestação, algumas anormalidades foram observadas nos rins de um dos fetos, como aumento da ecogenicidade cortical, espessamento cortical, perda da relação corticomedular (1: 1), pelve renal e dilatação do ureter por conteúdo ecogênico. Os diâmetros biparietal e abdominal também foram menores que os dos demais fetos, que não apresentaram anormalidades, sendo compatíveis com a idade gestacional estimada. No entanto, a frequência cardíaca foi semelhante entre todos os fetos. No 58º dia, observamos no feto subdesenvolvido que ambos os rins ainda apresentavam as anormalidades vistas anteriormente, além da presença de estrutura cística no rim direito, na topografia craniana do córtex.

Os demais fetos continuaram apresentando achados ultrassonográficos normais, batimentos cardíacos normais, todos compatíveis com a idade gestacional ultrassonográfica. O parto ocorreu sem complicações e apenas o feto subdesenvolvido natimorto. Em seguida, foi submetido à necropsia onde foi constatada na análise histopatológica nefrite intersticial crônica.

Discussão: O pré-natal adequado é importante para detectar anormalidades nos fetos, em que o exame ultrassonográfico permite acessar o desenvolvimento

² Este artigo corresponde ao artigo científico publicado na revista Acta Scientiae Veterinariae, 2021.49 (Suppl 1).

fetal. A gestação na cadela parecia estar ocorrendo sem complicações, mas o modo B e as técnicas de ultrassom de alta definição foram capazes de identificar o desenvolvimento anormal dos rins do feto. Ambas as técnicas mostraram-se seguras para o feto e para a mãe, por serem não invasivas e isentas de radiação. Esses achados, diferentes dos descritos como normais para um feto, reforçam o sinal de alerta para um possível estabelecimento de anomalias compatíveis com nefropatia. Ainda assim, a histopatologia é importante para excluir outras doenças e ajudar a definir o prognóstico. A nefrite intersticial pode afetar significativamente o inquérito perinatal, visto que o feto nasceu morto, confirmando que a descrição de tais anomalias pode auxiliar na prevenção da doença. Como a nefrite pode estar associada ao uso de alguns medicamentos, a orientação do proprietário quanto ao uso de medicamentos durante a gestação da cadela é fundamental. Portanto, este é o primeiro relato que descreve alterações renais em feto canino, o que destaca a importância do exame ultrassonográfico para a identificação da doença no pré-natal. Por último, o ultrassom de alta resolução (HD) pode fornecer informações detalhadas sobre anormalidades no rim fetal.

Palavras-chave: anormalidades fetais, cão, rim, ultrassonografia gestacional, cuidado pré-natal.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico e a avaliação ultrassonográfica do trato urinário fetal como parte do pré-natal em humanos são realizados há muitos anos [9]. Ainda, ao detectar possíveis anormalidades nos fetos, pode-se fazer o tratamento precoce das obstruções e infecções do trato urinário, evitando danos mais graves aos indivíduos, como a perda da função renal [8]. Na medicina veterinária, alguns estudos indicam a possibilidade e importância da avaliação ultrassonográfica pré-natal dos rins e do desenvolvimento normal em cães [3]. No entanto, até o momento, nenhum relatório foi encontrado descrevendo especificamente as anormalidades ultrassonográficas dos rins fetais em animais.

Dentre as principais lesões que podem comprometer a funcionalidade renal, a nefrite intersticial é uma anormalidade que causa diminuição da filtração glomerular, dilatação da pelve renal e dos cálices, resultando em atrofia progressiva e aumento do parênquima renal [14]. A nefrite intersticial aguda é uma causa frequente de lesão renal aguda e, embora seja reversível, a doença pode progredir, causar fibrose e tornar-se crônica [10], levando à inflamação intersticial e destruição tubular [13].

O diagnóstico é realizado com base na história, exames de sangue e urina e exame de ultrassonografia, onde, no adulto, observa-se aumento da ecogenicidade da região cortical e / ou medular, seja nos casos agudos ou crônicos de nefrite intersticial [4]. Além disso, a biópsia renal auxilia no diagnóstico e estadiamento da doença [7]. Este estudo tem como objetivo descrever, durante o exame pré-natal, os achados ultrassonográficos do modo B e de alta resolução dos tecidos renais de um feto canino com nefrite intersticial.

CASO

Uma fêmea Pug, 4 anos, multípara, com aproximadamente 5 kg, foi encaminhada para avaliação ultrassonográfica para diagnóstico de gravidez, acompanhamento e avaliação da viabilidade fetal e estimativa da idade gestacional.

O exame gestacional foi realizado em aparelho de ultrassom (ACUSON S2000) 1 equipado com transdutor linear de 9,0 MHz e transdutor digital de alta resolução com frequência padronizada em 17,0 MHz.

A primeira avaliação foi realizada aos 25 dias de gestação, onde foram detectadas quatro vesículas embrionárias com achados compatíveis com o período gestacional e dentro dos limites da normalidade. Aos 45 dias, nova avaliação ultrassonográfica foi realizada, e um dos fetos apresentou-se subdesenvolvido ou de tamanho reduzido quando comparado aos outros (fetos normais: diâmetro biparietal de 1,63 cm e diâmetro abdominal de 2,45 cm; feto com tamanhos reduzidos: diâmetro biparietal de 1,41 cm e diâmetro abdominal de 1,59 cm). Na ultrassonografia de alta definição (HD), ambos os rins apresentavam espessamento da porção cortical, associado à hiperecogenicidade cortical e perda da relação corticomedular (1: 1). Além disso, a pelve renal e os ureteres do feto subdesenvolvido estavam marcadamente dilatados por conteúdo anecóico (Figura 1), enquanto os demais fetos não apresentavam anormalidades, apresentando desenvolvimento normal, compatível com a idade gestacional estimada.

Aos 58 dias de gestação, a fêmea foi avaliada novamente por ultrassonografia, sendo possível verificar no feto subdesenvolvido que ambos os rins ainda apresentavam as anormalidades vistas anteriormente (Figura 2A).

Além disso, uma estrutura cística na topografia craniana do córtex renal foi encontrada no rim direito (Figura 2B). No entanto, os demais fetos apresentavam achados ultrassonográficos normais, batimento cardíaco normal, compatível com a idade gestacional ultrassonográfica.

O parto ocorreu de forma natural, sem complicações, porém, um dos fetos, o menor, nasceu morto enquanto os demais estavam saudáveis. O natimorto foi encaminhado para necropsia, onde tecidos de rins, cérebro e fígado foram coletados e fixados em solução de formaldeído tamponado a 10% (pH 7,4). As lâminas histológicas foram preparadas seguindo os protocolos de rotina, e a coloração com hematoxilina-eosina² foi utilizada para a realização da análise histopatológica.

Ao exame histopatológico, apenas o tecido renal apresentava algumas anormalidades, caracterizadas como nefrite intersticial crônica e discreta, com áreas hemorrágicas e focos de esclerose glomerular (Figura 3).

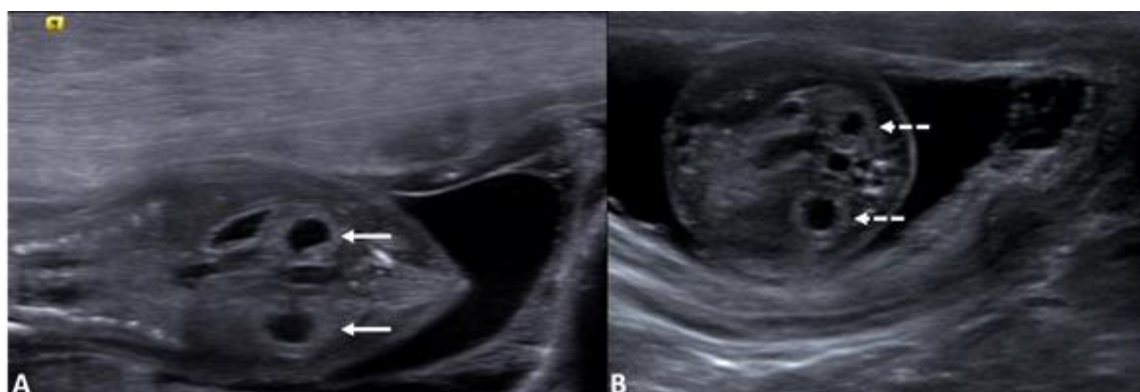


Figura 1. Imagem de ultrassom de alta definição (HD) de feto canino com 45 dias de gestação. A- Seção longitudinal (setas contínuas). B- Corte transversal dos rins (setas pontilhadas). Estruturas renais com córtex espessado e ecogenicidade aumentada também são notadas, assim como a perda da relação corticomedular e pelve renal marcadamente dilatada por um conteúdo anecoico.

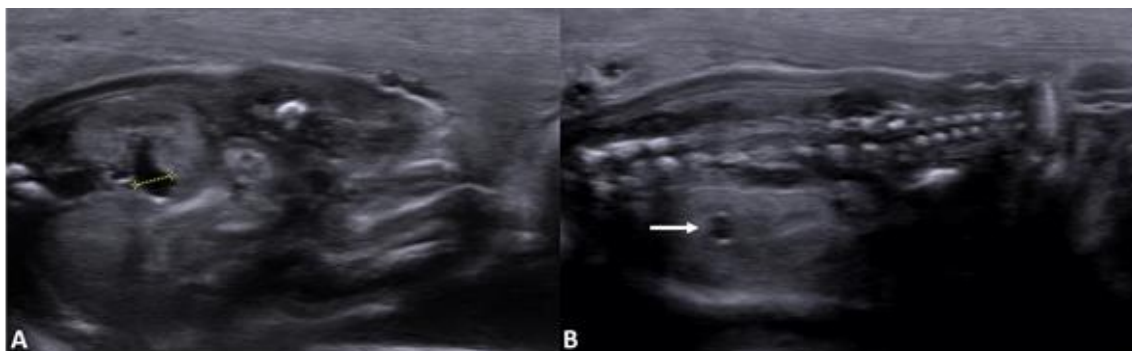


Figura 2. Imagem ultrassonográfica (HD) de alta definição de feto canino com 58 dias de gestação. A- Rim esquerdo mostrando ureter aumentado (entre os cursores). B- Rim direito apresentando cisto no córtex (seta).

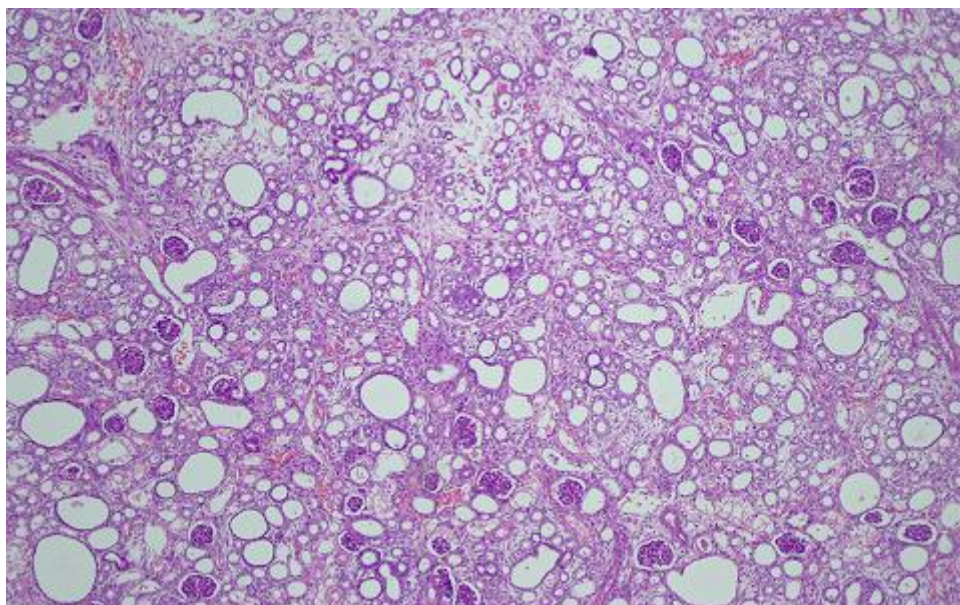


Figura3. Imagem histológica mostrando esclerose glomerular multifocal moderada, intercalada por focos hemorrágicos secundários e necróticos organizados na região intersticial, permeados por agregados de linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Diagnóstico: Nefrite intersticial crônica.

DISCUSSÃO

A importância de descrever a ocorrência das anormalidades diagnosticadas no pré-natal reforça a necessidade de um exame aprofundado do desenvolvimento fetal. Apesar da cadela ser considerada saudável e sem sinais de complicações durante a gestação, foi possível, por meio da técnica de ultrassom, detectar o subdesenvolvimento fetal e algumas anomalias, mais especificamente, nos rins. O diagnóstico pré-natal bem-sucedido e preciso de malformações do trato urinário pode alterar o curso da gravidez e o tratamento [8].

Geralmente, a biópsia renal é necessária para auxiliar no diagnóstico de anormalidades, entretanto, este é um procedimento invasivo e ocasionalmente está associado a complicações [12]. Por outro lado, as técnicas de ultrassom B e HD permitem avaliações morfológicas não invasivas e detalhadas sem o uso de radiação [7,16], o que é uma característica importante, principalmente em pacientes grávidas.

Anormalidades relacionadas ao parênquima e ao tamanho da pelve renal em fetos humanos têm sido utilizadas como base para a detecção de doenças renais [1,2]. Neste relato, foi possível verificar que aos 45 e 58 dias de gestação, ambos os rins do feto subdesenvolvido apresentavam características hiperecogênicas e espessamento cortical.

Diferentemente, Gil et al. [5] relataram que de 35 a 40 dias de gestação o rim fetal normal apresentava pelve renal dilatada, córtex espessado e sem definição medular cortical. Porém, ao avaliá-lo aos 55 dias de gestação, o rim fetal se assemelha a um rim de animal adulto, com córtex delgado, com definição corticomedular e sem dilatação da pelve renal. Assim, esses achados levantam uma questão sobre o possível estabelecimento de anormalidades consistentes com nefropatia.

A nefrite intersticial crônica é descrita ao exame histopatológico como nefrite intersticial tubular associada à esclerose glomerular e alterações vasculares leves [6], o que corrobora os achados do presente estudo. Mesmo não sendo o diagnóstico da fase crônica, a histopatologia é fundamental para excluir outras doenças como a glomerulonefrite progressiva e a amiloidose, além de especificar o grau de fibrose, ajudando a definir o prognóstico.

A identificação pré-natal de anomalias renais oferece opções mais amplas de decisão mesmo durante a gravidez, pois afetam significativamente a morbimortalidade perinatal [2], conforme observado no presente estudo, em que o feto acometido nasceu morto. Além disso, o diagnóstico pré-natal também funciona como um mecanismo essencial na detecção precoce de anomalias fetais, que podem se apresentar mais tarde, possivelmente com sequelas mais avançadas [2]. Portanto, a descrição de tais deformidades pode auxiliar na prevenção de doenças, sendo este o primeiro caso relatado em fetos caninos. De fato, a nefrite intersticial está associada principalmente ao uso de medicamentos [11], tornando imprescindível a orientação aos donos de animais, quanto ao uso indiscriminado de medicamentos durante a gestação dos animais. Ainda assim, é importante citar que a leptospirose pode ser outra causa de nefrite intersticial em animais domésticos [14] e, portanto, sua prevenção é fundamental.

O presente estudo descreveu pela primeira vez os achados ultrassonográficos do rim de um feto canino com nefrite intersticial crônica. O exame ultrassonográfico foi de extrema importância para o diagnóstico dessa doença no pré-natal. A ultrassonografia (HD) de alta resolução parece fornecer uma melhor avaliação do desenvolvimento fetal, permitindo a identificação de anormalidades detalhadas no rim.

MANUFACTURERS

1Siemens AG. Munique, Bayern, Alemanha.

2Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda. Pinhais, PR, Brasil.

Agradecimentos. Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (protocolo FAPESP números: 2017 / 14957-6 e 2019 / 15282-8) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de pesquisa, bolsa produtividade (processos 430023 / 2018-9 e 309199 / 2017-4) e bolsa de doutorado.

Conflito de interesse. Os autores informam que não há conflitos de interesse. Os autores são os únicos responsáveis pelo conteúdo e redação do artigo.

REFERÊNCIAS

- 1 Devriendt A., Cassart M., Massez A., Donner C. & Avni F.E. 2013.** Fetal kidneys: additional sonographic criteria of normal development. *Prenatal Diagnosis*. 33(13): 1248-1252. DOI: 10.1002/pd.4240
- 2 Dias T., Sairam S. & Kumarasiri S. 2014.** Ultrasound diagnosis of fetal renal abnormalities. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 28(3): 403-415. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2014.01.009
- 3 Feliciano M.A.R., Cardilli D.J., Nepomuceno A.C., Crivalero R.M., Silva M.A.M., Coutinho L.N., Oliveira M.E.F. & Vicente W.R.R. 2014.** Echobiometrics kidney and renal artery triplex doppler of canine fetuses. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66(2): 445-449. DOI: 10.1590/1678-41626120
- 4 Garcia P.H.S. & Vac M.H. 2019.** Rins e Ureters. In: Feliciano M.A.R., Assis A.R. & Vicente W.R.R. (Eds). *Ultrassonografia em Cães e Gatos*. São Paulo: MedVet, pp.177-216.

- 5 Gil E.M.U., Garcia D.A.A., Giannico A.T. & Froes T.R. 2018.** Early results on canine fetal kidney development: Ultrasonographic evaluation and value in prediction of delivery time. *Theriogenology*. 107: 180-187. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.015
- 6 Jayasumana C. 2019.** Chronic Interstitial Nephritis in Agricultural Communities (CINAC) in Sri Lanka. *Seminars in Nephrology*. 39(3): 278-283. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2019.02.006
- 7 Jayasumana C., Orantes C., Herrera R., Almaguer M., Lopez L., Silva L.C., Ordunez P., Siribaddana S., Gunatilake S. & De Broe M.E. 2016** Chronic interstitial nephritis in agricultural communities: a worldwide epidemic with social, occupational and environmental determinants. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 32(2): 234-241. DOI:10.1093/ndt/gfw346
- 8 Kurjak A., Latin V., Mandruzzato G., D'Addario V. & Rajhvajn B. 1984.** Ultrasound diagnosis and perinatal management of fetal genito-urinary abnormalities. *Journal of Perinatal Medicine*. 12(6): 291-312. DOI: 10.1515/jpme.1984.12.6.291
- 9 Lawson T.L., Foley W.D., Berland L.L. & Clark K.E. 1981.** Ultrasonic evaluation of fetal kidneys. *Radiology*.138(1): 153-156. DOI: 10.1148/radiology.138.1.7455076
- 10 Oliva-Damaso N., Oliva-Damaso E. & Payan J. 2018.** Acute and Chronic Tubulointerstitial Nephritis of Rheumatic Causes. *Rheumatic Disease Clinics*. 44(4): 619-633. DOI: 10.1016/j.rdc.2018.06.009
- 11 Praga M. & González E. 2010.** Acute interstitial nephritis. *Kidney International*. 77(11): 956-961. DOI: 10.1038/ki.2010.89
- 12 Rivers B.J., Walter P.A., Polzin D.J. & King V.L. 1997.** Duplex doppler estimation of intrarenal pourcelot resistive index in dogs and cats with renal disease. *Journal of Veterinary International Medicine*. 11(4): 250-260, DOI:10.1111/j.1939-1676.1997.tb00099.x.
- 13 Robertson L.J. 1986.** Spontaneous renal disease in Dogs. *Toxicologic Pathology*. 14(1): 101-108. DOI:10.1177/019262338601400112
- 14 Yang C.W. 2018.** Leptospirosis Renal Disease: Emerging Culprit of Chronic Kidney Disease Unknown Etiology. *Nephron*. 138(2): 129-136. DOI:10.1159/000480691