

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ULTRASSONOGRAFIA MODO-B E ELASTOGRAFIA DA
ESTRUTURA UTEROPLACENTÁRIA DURANTE O
PERÍODO GESTACIONAL E PÓS-PARTO DE CADELAS**

Ana Paula Rodrigues Simões
Médica Veterinária

2019

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

**ULTRASSONOGRAFIA MODO-B E ELASTOGRAFIA DA
ESTRUTURA UTEROPLACENTÁRIA DURANTE O
PERÍODO GESTACIONAL E PÓS-PARTO DE CADELAS**

Discente: Ana Paula Rodrigues Simões

Orientador: Prof. Dr. Marcus Antonio Rossi Feliciano

Coorientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Andres Ramirez Uscategui

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

S593u	Simões, Ana Paula Rodrigues Ultrassonografia modo-b e elastografia da estrutura uteroplacentária durante o período gestacional e pós-parto de cadelas / Ana Paula Rodrigues Simões. -- Jaboticabal, 2019 64 p. : tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Marcus Antonio Rossi Feliciano Coorientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente 1. Cães. 2. Ultrassonografia. 3. Gravidez. 4. Puerpério. 5. Útero. I. Título.
-------	---

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ULTRASSONOGRAFIA MODO-B E ELASTOGRAFIA DA ESTRUTURA UTEROPLACENTÁRIA DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL E PÓS-PARTO DE CADELAS

AUTORA: ANA PAULA RODRIGUES SIMÕES

ORIENTADOR: MARCUS ANTÔNIO ROSSI FELICIANO

COORIENTADOR: WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE

COORIENTADOR: RICARDO ANDRES RAMIREZ USCATEGUI

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

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

RP
Prof. Dr. RICARDO PERECIN NOCITI
FZEA/USP / Pirassununga/SP

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

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

Victor Santos
Pós-doutorando VÍCTOR JOSÉ CORREIA SANTOS
Depto de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 05 de dezembro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Ana Paula Rodrigues Simões - nascida em São Paulo (SP), Brasil, em 01 de dezembro de 1986. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/UNESP, Câmpus de Jaboticabal (2007 - 2011). Fez residência em Obstetrícia Animal pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/UNESP, Câmpus de Jaboticabal (2012 - 2014). Durante a residência foi bolsista da FUNDAP (Fundação do Desenvolvimento Administrativo do Estado de São Paulo). Mestre em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal, pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/UNESP, Câmpus de Jaboticabal (2014 - 2016), sob orientação do Prof. Dr. Marcus Antonio Rossi Feliciano. Durante o mestrado foi bolsista FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). Atualmente é Doutoranda do programa de Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal, pela mesma instituição, sob orientação do Prof. Dr. Marcus Antonio Rossi Feliciano e coorientação do Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente e Prof. Dr. Ricardo Andres Ramirez Uscategui. Bolsista CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Possui experiência na área de teriogenologia, neonatologia, fisiologia e ultrassonografia reprodutiva em pequenos animais, com linha de pesquisa em ultrassonografia, atuando em novas técnicas ultrassonográficas para cães.

*“O sucesso é a capacidade de ir de um fracasso
ao outro sem perder o entusiasmo”
(Winston Churchill)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, por ter me atribuído alma e missões, possibilitar caminhos e encontros mágicos sendo meu guia e protetor para que adversidades e provações fossem motivo de força e escada para a realização desse sonho. Obrigada Deus por ser bom o tempo todo!

A minha mãe, Maria Izilda, o anjo que Deus me deu de presente, por seu amor imensurável, por compreender, apoiar e proteger esse meu voo, por suas orações, força, por ser minha fiel ouvinte, acreditar no meu potencial, ser minha amiga e a base sólida da nossa família; meu maior e melhor exemplo de mulher e mãe, se um dia for 1/3 do que a Senhora é, serei honrada. Sou grata a Deus por permitir esse nosso reencontro, desse nosso amor de outras vidas.

Ao meu pai, Manuel, por ser meu herói de carne e osso, exemplo de determinação, inteligência e caráter, pelo apoio e amor incondicional, pelos subsídios a realização do meu sonho, por nossas conversas que me instruíram a ser uma pessoa determinada em busca dos meus ideais, ensinando que nada acontece por acaso e a busca não é fácil, mas que o impossível não existe. Por ser sempre meu ídolo.

Ao meu irmão, Gustavo, por me ensinar a compreender as diferenças e por mostrar que irmãos são nossos pais presentes em nós. Obrigada pela minha afilhada Manuella e sobrinhas Laura e Vallentina que são minha extensão de amor.

Aos meus avôs (*in memoriam*) Guiomar Rodrigues, Geraldo Rodrigues, Delminda dos Santos Nova e Manoel Simões da Conceição, por serem o sublime ponto de partida do amor presente em nossa família, os sinto sempre comigo, a saudade é eterna.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcus Antônio Rossi Feliciano, obrigada pela responsabilidade confiada, oportunidade, incentivo, ensinamentos, recursos e técnicas oferecidas na execução desse projeto possibilitando o mesmo.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, obrigada por ser meu pai científico desde a residência e acima de tudo meu amigo, sou grata pelas oportunidades, conversas, confiança e carinho. Obrigada pelo exemplo, segue meu respeito e admiração.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Ricardo Andres Ramirez Uscategui, obrigada pela disponibilidade, por sempre ser presente, por partilhar seu vasto conhecimento e conceitos enriquecendo essa produção.

A Marjury Maronezi, minha companheira desde o mestrado, obrigada por dividir comigo essa jornada de grande enriquecimento pessoal e profissional, pelo aprendizado e incansáveis horas dedicadas a realização desse trabalho, por ter tornado essa caminhada mais leve, ela não teria sido a mesma sem você. Obrigada pela amizade.

Aos pós-graduandos (as) da salinha da Reprodução, aos que foram e aos que estão (Marjury Maronezi, Pri del Alguila, Mariana Kako, Pri Silva, Beatriz Gasser, Letícia Pavan, Renata Mariano, Vivian Tavares, Michelle Avante, Giovanna Maciel, Victor Santos, Luiz Aires, Cristhian Estrada, Igor Kniphoff) obrigado pelas experiências partilhadas, pelos socorros, disposição e amizade, pelo forte grupo de estudos e família que nos tornamos, as recordações ficarão para sempre guardadas em meu coração.

Ao Departamento de Reprodução Animal “Família Obstetrícia”, pelo acolhimento e assistência profissional. Sinto-me lisonjeada por ter feito parte dessa equipe.

Aos Professores Doutores Luciana Cristina Padilha Nakaghi, Ricardo Perecin Nociti e Felipe Farias Pereira da Câmara Barros e ao Dr. Victor José Correia Santos pela participação na comissão examinadora, disponibilidade e considerações na elaboração desse trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e auxílio pesquisa, processo número 140189/2017-3.

A Unesp Jaboticabal, que foi e sempre será minha segunda casa, onde meu coração bate mais forte, onde passei os melhores e mais desafiadores momentos da minha vida, onde cresci e amadureci. Obrigada pelos 13 anos de acolhimento, crescimento pessoal e profissional da graduação a pós-graduação.

Aos funcionários do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel e do Departamento de Reprodução Animal pela atenção, carinho e ajuda dispensada. Em especial a minha amiga/mãe Rosana Vilella, por todo carinho, amizade, conselhos e suporte, obrigada por ser minha segunda mãe em Jaboticabal.

Ao CNPq pela bolsa de produtividade, processo número 309199 / 2017-4, à FAPESP pela bolsa de estudos do projeto temático (processo 2017 / 14957-6), ao programa EMU (Processo 2019 / 09197-8) e ao Jair Matos e Siemens Healthineers pela assistência técnica.

A minha segunda família, que Deus permitiu que eu escolhesse meus amigos. Em especial Marcela Soriani e Janaina Bara, obrigada pela irmandade, por me provarem que verdadeiras amizades continuam a crescer, mesmo a longas distâncias e por proporcionarem sempre o mesmo sentido no reencontro.

A minha prima-irmã Raquel Cristina Rodrigues, obrigada por estar sempre por perto, por sua amizade e torcida pela minha felicidade. Obrigada pela minha afilhada Júlia.

Aos canis, residentes e pós-graduandos que colaboraram com esse experimento.

Aos meus pacientes, obrigada por serem sempre os melhores professores, ensinando através de olhares o que não estava escrito nos livros, o imprevisível, por serem o maior e melhor motivo que me fez chegar até aqui, em especial a minha filha Sushi e aos meus primeiros amores Summer (*in memorian*) e Angel.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	1
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	2
2.1 Placentação	2
2.2 Anatomia e histologia uterina	3
2.3 Fisiologia e endocrinologia do puerpério.....	4
2.4 Avaliação placentária e purpéral por ultrassonografia modo-B.....	5
2.5 Elastografia Acoustic Radiation Force Impulse - ARFI.....	5
3. Referências	8
CAPÍTULO 2 – Avaliação da elastografia ARFI e biometria placentária em cadelas.....	13
RESUMO.....	13
1. Introdução	14
2. Materiais e métodos	16
2.1 Aspectos éticos e animais.....	16
2.2 Protocolo experimental	17
2.2.1 Inseminação artificial	17
2.2.2 Avaliação ultrassonográfica ao modo-B.....	17
2.2.3 Avaliação da elastografia ARFI.....	19
2.2.4 Escore apgar	20
2.3 Análise estatística	20
3 Resultados	21

4. Discussão	25
5. Conclusão	30
Referências	31
CAPÍTULO 3 – Avaliação elastográfica e biométrica do útero pós-parto de cadela submetidas à parto normal ou cesariana ¹	39
Abstract	39
1. INTRODUCTION	41
2. MATERIALS AND METHOD	43
2.1 Ethical aspects and animals	43
2.2 Experimental protocol	43
2.2.1 Gestational monitoring	43
2.2.2 C-section	44
2.2.3 Apgar score	44
2.2.4 B-mode ultrasonography assessment	45
2.2.5 ARFI elastography assessment	46
2.3 Statistical analysis	47
3. RESULTS	48
4. DISCUSSION	53
5. CONCLUSION	57
REFERENCES	58

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

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto intitulado **"Ultrassonografia modo B, Elastografia Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) e Doppler da estrutura uteroplacentária durante o período gestacional e pós-parto de cadelas"**, protocolo nº 9.884/16, 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 junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da 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 18 de agosto de 2016.

Vigência do Projeto	07/07/2016 a 07/12/2019
Espécie / Linhagem	Canina/Braquicefálicos
Nº de animais	12 animais
Peso / Idade	5 – 15kg / 1-5 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Robôs dos Serviços de Obstetrícia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Câmpus de Jaboticabal e de canis criadores da região de Jaboticabal.

Jaboticabal, 18 de agosto de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
 Coordenadora – CEUA

ULTRASSONOGRAFIA MODO-B E ELASTOGRAFIA DA ESTRUTURA UTEROPLACENTÁRIA DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL E PÓS-PARTO DE CADELAS

RESUMO – Os objetivos deste estudo foram avaliar e caracterizar a estrutura uteroplacentária durante o período gestacional e pós-parto, em cadelas submetidas a cesariana ou parto normal por meio da ultrassonografia modo-B e elastografia “Acoustic Radiation Force Impulse” (ARFI). Foram utilizadas 12 cadelas braquicefálicas, com peso entre 10 a 15 quilos e 2 a 5 anos. Após revisão do histórico clínico, realização de exames prévios e verificada a hígidez, as gestantes foram submetidas aos exames ultrassonográfico convencional e elastografia da estrutura uteroplacentária, com a utilização do aparelho ultrassonográfico ACUSON S2000™/SIEMENS® equipado com transdutor linear de 9,0 MHz. A avaliação da estrutura placentária (materna, fetal e materno-fetal) foi realizada diariamente a partir do dia 15 de gestação ao parto; do dia 56 de gestação à parturição as avaliações foram realizadas a cada 12 horas. O estudo da involução uterina (miométrio e endométrio) iniciou imediatamente após o parto, sendo diário e até o dia 10 do puerpério. Foram verificados biometria (mm); velocidade da onda de cisalhamento (SWV m/s) e rigidez tecidual através dos softwares VTTQ™ (Virtual Touch™ Tissue Quantification) e VTIQ™ (Virtual Touch™ Tissue Imaging Quantification). Os resultados das variáveis foram comparados pela análise de variância (ANOVA). A significância estatística foi estabelecida em 95% ($P < 0,05$). A espessura placentária materno-fetal aumentou até o dia 63 de gestação ($P < 0,0001$; $R^2 = 0,91$), a espessura materna aumentou até o dia 40 de gestação ($P = 0,0340$; $R^2 = 0,54$) e a espessura fetal até o dia 50 de gestação ($P < 0,0001$; $R^2 = 0,83$). A velocidade da onda de cisalhamento (SWV) da área dorsal ($P < 0,0010$) foi maior que a lateral, que por sua vez foi maior ($P = 0,020$) que a área ventral. A SWV da área dorsal, determinada pelo VTTQ™, diminuiu do dia 21 ao dia 35 e aumentou no dia 56 da gestação ($P = 0,0291$; $R^2 = 0,4021$); A SWV lateral diminuiu do dia 24 ao dia 45 e aumentou até o momento do parto ($P < 0,001$; $R^2 = 0,6055$). A SWV da área dorsal, conforme determinada pelo VTIQ™, diminuiu do dia 21 ao dia 43 e depois aumentou no dia 60 da gestação ($P = 0,0016$; $R^2 = 0,5075$); e a SWV da área ventral aumentou do dia 21 ao dia 23 e diminuiu até o momento do parto ($P < 0,001$; $R^2 = 0,8055$). O diâmetro uterino foi maior ($P = 0,012$) no pós-parto dos animais submetidos à cesariana ($15,26 \pm 4,73$ mm) comparado ao parto normal ($12,53 \pm 2,64$ mm) durante os primeiros sete dias pós-parto. A espessura uterina evoluiu gradualmente nos dois grupos ($P < 0,0001$), o miométrio durante os primeiros nove dias ($P = 0,005$) e o endométrio durante os primeiros seis dias ($P = 0,003$). As SWV's miométriais e endométriais foram semelhantes entre os tipos de parto ($P = 0,7846$ e $0,8273$) e apresentaram aumento gradual ($P = 0,411$; $0,0043$, respectivamente), durante os primeiros 10 dias pós-parto. As avaliações foram factíveis e não causaram alterações na viabilidade materna, fetal ou neonatal, com resultados promissores e correspondência com o desenvolvimento gestacional normal, constituindo o primeiro estudo a empregar a ARFI na avaliação da estrutura uteroplacentária em cadelas, fornecendo bases para estudos que envolvam processos patológicos em outras espécies.

Palavras-chave: biometria, canino, elastografia, gestação, puerpério, uteroplacentária

B-MODE ULTRASSONOGRAPHY AND ELASTOGRAPHY OF UTEROPLACENTARY STRUCTURE DURING GESTATION AND POSTPARTUM IN BITCHES

ABSTRACT – The objectives of this study were to evaluate and characterize the uteroplacental structure during gestational and postpartum periods in bitches using B-mode ultrasound and Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI). Twelve brachycephalic bitches, weighing between 10 - 15 kg and 2 - 5 years, were used. After revision of clinical history, general examination and verified the healthiness, pregnant underwent to conventional ultrasonographic and elastography examinations of uteroplacental structure, using ACUSON S2000™ ultrasound / SIEMENS® equipped with a 9.0 MHz linear transducer. The evaluation of the placental structure (maternal, foetal and maternal-foetal) was performed daily from the day 15 of gestation to delivery; from the day 56 of gestation to the parturition evaluations were performed every 12 hours. The study of uterine involution (myometrium and endometrium) started immediately after delivery, being daily until the day 10 of puerperium. Was verified biometry (mm); shear wave velocity (SWV m / s) and tissue stiffness through softwares VTTQ™ (Virtual Touch™ Tissue Quantification) and VTTIQ™ (Virtual Touch™ Tissue Imaging Quantification). The results of the variables were compared by analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was set at 95% ($P < 0.05$). Maternal-fetal placental thickness increased to day 63 ($P < 0.0001$; $R^2 = 0.91$); maternal placental thickness increased until day 40 ($P = 0.0340$; $R^2 = 0.54$); and fetal placental thickness increased to day 50 ($P < 0.0001$; $R^2 = 0.83$) of gestation. Shear wave velocity (SWV) of the dorsal ($P < 0.0010$) was greater than lateral, which in turn was greater ($P = 0.020$) than the ventral area. The SWV of the dorsal area as determined using VTTQ, decreased from day 21 to 35 and increased to day 56 of gestation ($P = 0.0291$; $R^2 = 0.4021$); lateral SWV decreased from day 24 to 45 and increased until the time of parturition ($P < 0.001$; $R^2 = 0.6055$). The SWV of the dorsal area, as determined using VTTIQ, decreased from day 21 to 43 and then increased to day 60 of gestation ($P = 0.0016$; $R^2 = 0.5075$); and ventral area SWV increased from day 21 to 23 and decreased until the time of parturition ($P < 0.001$; $R^2 = 0.8055$). Uterine diameter was higher ($P = 0.012$) in the post-partum period of the animals submitted to c-section (15.26 ± 4.73 mm) than in normal birth (12.53 ± 2.64 mm) during the first 7 days post-partum. Uterine thickness gradually involuted in both groups ($P < 0.0001$), the myometrium during the first 9 days ($P = 0.005$) and the endometrium during the first 6 days ($P = 0.003$). The myometrial and endometrial SWVs were similar between types of delivery ($P = 0.7846$ and 0.8273) and presented a gradual increase ($P = 0.411$; 0.0043 , respectively), during the first 10 day post-partum. The evaluations were feasible and did not cause changes in maternal, foetal or neonatal viability, with promising results and correspondence with normal gestational development, being the first study to use ARFI to evaluate the uteroplacental structure in bitches, providing bases for studies involving pathological processes in other species.

Keywords: biometry, canine, elastography, gestation, puerperium, uteroplacental

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. Introdução

A placenta é um órgão vascular que se forma no curso da gestação, em que se estabelece a comunicação entre o organismo materno e feto, feita pelo cordão umbilical. Desempenha função de suprimento de oxigênio, remoção de detritos metabólicos, produção e secreção de hormônios, fatores de crescimento e regulação do ambiente uterino fetal (Prestes e Alvarenga, 2006). A avaliação desse tecido é primordial considerando que fatores de subdesenvolvimento embrionários estão associados a afecções placentárias, região de implantação inerente a distúrbios nutricionais e restrição de crescimento individual (Johnston et al., 2001).

Puerpério caracteriza a fase imediatamente após o parto, que se estende desde a expulsão da placenta do último filhote até o momento em que o útero retorna ao estado normal de não gestante, incluindo a involução uterina e regeneração endometrial (Feldman e Nelson, 1986).

A ultrassonografia obstétrica é o método de imagem mais utilizado na reprodução veterinária, considerada técnica precisa, segura e de baixo custo (Mattoon e Nyland, 2015). É empregada na realização de diagnóstico e determinação da idade gestacional, avaliação das estruturas materno-fetais, desenvolvimento e viabilidade fetal, identificação de defeitos congênitos, anormalidades gestacionais, condições ovarianas e uterinas e puerpério (Serra e Guimarães, 1996; Feldman e Nelson, 1996; Aissi e Slimani, 2008; Lopate, 2008; Davidson e Baker, 2009).

Ressalta-se entre as novas técnicas de imagem implementadas na medicina a elastografia, que vem apresentando resultados promissores, fato que propicia a utilização deste método em medicina veterinária, particularmente no cão, considerando sua importância econômica, afetiva e de similaridade científica para o homem (Simões, 2016). Em veterinária, a elastografia ARFI é uma técnica de imagem recente, segura e não invasiva, que fornece medidas quantitativas e qualitativas da rigidez dos tecidos com variabilidade interobservador reduzida (Carvalho et al., 2015). Não há relatos sobre o uso da ARFI na avaliação uteroplacentária em cadelas.

Hipotetiza-se que: i) a biometria placentária ao modo-B permite predição da idade gestacional; ii) a estrutura placentária apresenta alteração na rigidez tecidual durante o desenvolvimento gestacional à elastografia; iii) contraste na biometria e rigidez uterina puerperal em cadelas submetidas a parto normal/cesariana.

Espera-se que a inclusão de técnicas inovadoras de diagnóstico por imagem em veterinária, como a elastografia, realizada no presente estudo, possa gerar perspectiva impactante e de valor diagnóstico singular em obstetrícia veterinária fornecendo referência para análises biométricas e elastográficas de tecidos gestacionais normais, base promissora para futuros estudos fisiopatológicos nas diversas espécies de interesse veterinário.

2. Revisão de Literatura

2.1 Placentação

A placenta é um órgão materno-fetal, constituído por porção fetal originária do saco coriônico e materna derivada do endométrio, responsável pela troca fisiológica entre o feto e a mãe, atua como barreira seletiva e órgão endócrino através da produção de estrógeno, progesterona e gonadotrofinas. Sua estrutura permite que a nutrição fetal, excreção e respiração ocorram através de difusão simples (oxigênio, dióxido de carbono, água e eletrólitos) ou transporte ativo (glicose, aminoácidos, lípidos e vitaminas) de moléculas de baixo peso molecular pela barreira placentária, sem permitir a transferência de moléculas de alto peso, material particulado e células sanguíneas (Mcgeady et al., 2006; Moore e Persaud, 2008).

Atualmente a classificação placentária adotada segue os padrões propostos por Leiser e Kaufmann (1994), assim a placenta canina é classificada como corioalantoica (alantocório intimamente em contato ao endométrio); zoonária (vilos coriônicos formam uma faixa ao redor do centro do saco coriônico onde se unem ao endométrio); lamelar (alantocório se comunica ao endotélio dos vasos sanguíneos maternos); endoteliocorial (ausência do epitélio endometrial e tecido conjuntivo materno, endotélio separa o sangue materno do tecido fetal) e decídua (estroma endometrial é eliminado junto às membranas

fetais); ressaltando ainda a presença de hematomas marginais no interior e exterior da cintura placentária (Dantzer e Leiser, 2012; Vejlsted, 2010).

A implantação demarca o primeiro estágio do desenvolvimento placentário, é precedida pela eclosão do blastocisto, com modificações que se principiam no útero e no embrião, consiste no contato físico, após a dissolução da zona pelúcida, entre o trofoblasto e o endométrio; esse processo é regulado por citocinas, hormônios, enzimas e outros fatores (Landim-Alvarenga, 2006a).

Após a implantação embrionária, que se inicia nas cadelas em torno do 18º dia após a ovulação (Chastant-Maillard et al., 2010), desencadeia a placentação, que constitui na formação e união das membranas fetais (cório, âmnio, saco vitelínico e alantóide) ao endométrio, sendo seu princípio fisiológico o intercâmbio entre o sangue materno e fetal (Dantzer e Leiser, 2012).

2.2 Anatomia e histologia uterina

Em cadelas, o útero é morfologicamente classificado como bicornual, dividido em três partes, sendo elas: dois cornos uterinos, o corpo e a cérvix (Alves e Covizzi, 2015).

A parede uterina é constituída de três camadas: a) mucosa ou endométrio, b) muscular ou miométrio e c) serosa ou perimétrio. O endométrio é composto de duas zonas que diferem tanto em estrutura como em função: a camada superficial, denominada zona funcional, possui epitélio colunar simples nas cadelas e sofre degeneração parcial ou completa depois da prenhez; a camada delgada profunda, intitulada zona basal, persiste e a zona funcional é restaurada a partir dessa camada. O miométrio figura de uma espessa camada circular interna e uma longitudinal externa de células musculares lisas que aumentam em número e tamanho durante a prenhez, e entre elas, há a camada vascular que estabelece comunicação com o endométrio. O perimétrio consiste em tecido conjuntivo frouxo revestido pelo mesotélio peritônio; células musculares lisas e grande número de vasos linfáticos, sanguíneos e fibras nervosas estão presentes nessa camada (Priedkalns e Leiser, 2012).

2.3 Fisiologia e endocrinologia do puerpério

O puerpério fisiológico é dividido em duas fases: a de delivramento (eliminação de secundinas) e a fase de involução e regeneração uterina (puerpério verdadeiro) (Toniollo e Vicente, 1993).

A fase de delivramento inicia imediatamente após o parto, sendo concluída com a eliminação das membranas fetais, viabilizada pela atividade contrátil miometrial e perda da aderência materno-fetal para eliminação de lóquios e regeneração epitelial. A secreção não eliminada através da cérvix por meio da contração uterina é absorvida pelo endométrio (Landim-Alvarenga, 2006b).

O fenômeno histoquímico de involução uterina ocorre após o desaparecimento da atividade da progesterona, com posterior liberação das enzimas dos grânulos citoplasmáticos resultante da lise do corpo lúteo gravídico. Embora histologicamente o processo de involução nas cadelas se complete em aproximadamente doze semanas após o parto, as primeiras mudanças endometriais ocorrem nas primeiras nove semanas; na primeira semana é observado sítios placentários com aspecto rugoso e glandular, acúmulo de muco e coágulos sanguíneos, cobertos por massa necrótica de colágeno e eosinófilos (Al-Bassam et al., 1981; Voorwald e Tiosso, 2015). O útero é relatado em seu diâmetro normal durante o anestro entre quatro e seis semanas após o parto no puerpério fisiológico, com regressão do diâmetro dos sítios placentários, é acompanhado de corrimento vaginal inicialmente serosanguinolento tornando viscoso; período crítico para o surgimento de transtornos puerperais (Jochle e Andersen, 1977; England et al., 2003).

O principal evento endócrino do parto é a alteração da razão estrógeno-progesterona, devido à queda de progesterona. O declínio desse hormônio reflete no descolamento placentário, dilatação da cérvix e aumento da contratilidade uterina. Ocorre aumento da sensibilidade do miométrio à ocitocina que estimula a produção de prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$) pelo útero (Concannon et al., 1989). Enquanto o início do puerpério é influenciado por prolactina e ocitocina que permanecem em níveis elevados, associado a produção láctea; os hormônios luteinizantes (LH) e folículo estimulante (FSH) permanecem em concentrações basais e reduzida concentração plasmática de relaxina (Steinetz et al., 1987; Oliveira e Júnior, 2006).

2.4 Avaliação placentária e periperal por ultrassonografia modo-B

O parto é um evento crítico e a possibilidade de prever com precisão a data de parição, permite planejamento da atividade de criadores e veterinários na assistência, reduzindo perdas de descendência no periparto, que apresentam impacto sentimental e importante prejuízo no patrimônio zootécnico, genético e econômico de canis e criadores (Beccaglia, 2015). A monitorização cuidadosa da gestante no período perinatal é essencial para uma gestão otimizada da gestação e parição (Kim et al., 2007).

Ao exame ultrassonográfico obstétrico é possível observar características da parede e conteúdo luminal, como diâmetro, espessura, arquitetura e ecogenicidade uterina em fêmeas caninas (Yeager e Concannon, 1990; Mahaffey et al., 1995; Alonso, 2006).

A restrição do crescimento intrauterino é uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade perinatal (Aucott et al., 2004; Bernstein et al., 2000), apresentando etiologia de acometimento fetal, placentária ou materna (Cox e Marton, 2009; Veerbeek et al., 2014). Assim, a medida ultrassonográfica do diâmetro uterino nos locais de implantação, espessura placentária e comprimento da placenta zonária é significativo e linearmente relacionado com a idade gestacional (England et al., 1990; Yeager et al., 1992; Luvoni e Grioni, 2000; Son et al., 2001), constitui marcador clínico importante na predição de recém-nascidos afetados pela restrição de fluxo sanguíneo uteroplacentário, como acontece nos humanos (Schwartz et al., 2012).

Edema ou espessamento placentário são condições fortemente associadas à complicações maternas, fetais e neonatais e podem indicar anormalidades ou alterações do fluxo sanguíneo, diminuindo a capacidade da placenta em drenar fluidos residuais fetais adequadamente ou placentite (Raio et al., 2004; Lopate, 2008).

2.5 Elastografia Acoustic Radiation Force Impulse - ARFI

A elastografia se baseia em uma das mais antigas técnicas semiológicas, a palpação, empregada para identificar anormalidades no volume, formato e consistência dos tecidos examinados. Procedimento seguro, tanto para o paciente quanto para o examinador, além de não ser invasivo e dispensar contenção química (Comstock, 2011).

Este método ultrassonográfico avalia a elasticidade dos tecidos e é capaz de estudar sua dureza ou rigidez (Ophir, 2002). A elasticidade é a propriedade de deformação de um tecido sujeito a força externa, essa deformação é inversamente proporcional à rigidez (Goddi et al., 2012). A elastografia avalia a elasticidade dos tecidos por diferentes métodos: elastografia por compressão ou tensão e elastografia dinâmica que envolvem a sonoelastografia/ transitória e elastografia por ondas de cisalhamento (ARFI) (Dudea et al., 2011; Carvalho et al., 2015).

A ARFI utiliza pulsos acústicos de curta duração para produzir deslocamentos no tecido examinado. Propicia melhor precisão no cálculo da elasticidade do tecido avaliado quando comparada a elastografia de compressão e é reprodutível facilmente, com resultado independente da habilidade do operador (Carvalho et al., 2015).

Para avaliação qualitativa, este método utiliza impulsos acústicos curtos e de alta intensidade para deformar os elementos do tecido e criar um mapa estático (elastograma) de rigidez tecidual relativa, fornece mapeamento em escala de cinza que demonstra a rigidez relativa dos tecidos da região estudada, comparando com a imagem ultrassonográfica modo-B correspondente, no qual as áreas mais claras representam tecidos mais elásticos (menos rígido) e mais deformáveis do que as áreas escuras (Goddi et al., 2012).

O estudo quantitativo ARFI utiliza impulso acústico primário em direção à região a ser examinada, promovendo a formação de ondas de pressão em propagação capaz de deformar os tecidos, captando a velocidade da propagação dessas ondas (cisalhamento). A velocidade de propagação e atenuação das ondas estão relacionadas com a rigidez e viscoelasticidade do tecido, onde as ondas apresentam maior velocidade em tecidos rígidos, sendo expressas em m / s (Comstock, 2011).

Recente atualização do software ARFI permitiu a análise qualitativa e quantitativa simultaneamente, com avaliação da qualidade do exame, o elastograma é formado em escala de cores, na qual tons vermelhos indicam tecidos mais rígidos, verde intermediários e azul menos rígidos; medidas quantitativas são obtidas posicionando um ou mais ROI (região de interesse) na área de interesse do elastograma (Maronezi et al., 2019).

Considerando a aplicabilidade clínica das técnicas ARFI, as imagens qualitativas apresentam maior resolução espacial, favorecendo a visualização de informação estrutural, como identificação de lesão ou monitoramento de áreas de ablação em pacientes humanos. Para outras aplicações clínicas, o estudo quantitativo demonstra melhor utilidade e tem se mostrado promissor para análise quantitativa da rigidez difusa de tecidos, diferenciação de lesões malignas e benignas, com base no estudo da rigidez absoluta e monitorização da progressão de uma enfermidade e resposta à terapia pelo paciente (Feliciano et al., 2014).

3. Referências

Aissi A, Slimani, S (2008) Ultrasonographic appearance of gestational structures throughout pregnancy in bitches. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences** 3:32-35.

Al-Bassam MA, Thomson RG, O'Donnell I (1981) Normal postpartum involution of the uterus in the dog. **Canadian Journal of Comparative Medicine** 45:217-232.

Alonso GG, Koivisto MB, Vicente WRR, Perri SHV, Feliciano MAR (2014) Avaliação ultrassonográfica dos efeitos da acupuntura na involução uterina em cadelas. **Ciência Animal Brasileira** 15:74-80.

Alves AE, Covizzi GJ (2015) Anatomia do Sistema Genital Feminino. In.: Apparício M, Vicente WRR (Eds.) **Reprodução e Obstetrícia em Cães e Gatos**. Editora MedVet, cap. 2, p. 9-15.

Aucott SW, Donohue PK, Northington FJ (2004) Increased morbidity in severe early intrauterine growth restriction. **Journal of Perinatology** 24:435-440.

Beccaglia M (2015) Determination of gestational time and prediction of parturition: an update. In: EVSSAR CONGRESS. **Congress Proceedings Book** Hannover 20-25.

Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ, Ohlsson A, Golan A (2000) Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. **American Journal of Obstetrics & Gynecology** 182:198-206.

Carvalho CF, Cintra TCF, Chammas MC (2015) Elastography: Principles and considerations for clinical research in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health** 7:99-110.

Chastant-Maillard S, Chebrou M, Thoumire S, Saint-Dizierb M, Chodkiewicz M, Reynaud K (2010) Embryo biotechnology in the dog: a review. **Reproduction, Fertility e Development** 22:1049-1056.

Comstock C (2011) Ultrasound elastography of breast lesions. **Ultrasound Clinics** 6:407-415.

Concannon PW, McCann JP, Temple M (1989) Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility** 39:3-25.

Cox P, Marton T (2009) Pathological assessment of intrauterine growth restriction. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology** 23:751-764.

Dantzer V, Leiser R (2012) Placentação. In.: Eurell JA, Frappier BL (Eds.) **Histologia Veterinária de Dellman**. São Paulo: Manole, SP, cap. 14, p. 279-297.

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

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

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

England GCW, Yeager AE, Concannon PW (2003) Ultrasound imaging of the reproductive tract of the bitch. In.: Concannon PW, England GCW, Verstegen JP, Linde-Forsberg C (Eds.) **Recent Advances in Small Animal Reproduction International Veterinary Information Service**, Ithaca, NY: International Veterinary Information Service.

Feldman EC, Nelson RW (1986) **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. Saunders WB. Philadelphia.

Feldman EC, Nelson RW (1996) Ovarian cycle and vaginal cytology. In.: Saunders WB (Eds.) **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia, p. 529-546.

Feliciano MAR, Cardilli DJ, Nepomuceno, AC, Crivelaro RM, Silva MAM, Coutinho MEF, Vicente WRR (2014) Echobiometrics kidney and renal artery triplex doppler of canine fetuses. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science** 66:445-449.

Goddi A, Bonardi M, Alessi S (2012) Breast elastography: a literature review. **Journal of Ultrasound** 15:192-198.

Jochle W, Andersen AC (1977) The estrous cycle in the dog: a review. **Theriogenology** 7:113-140.

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

Kim BS, Son CH (2007) Time of initial detection of fetal and extra fetal structures by ultrasonographic examination in miniature schnauzer bitches. **Journal of Veterinary Science** 8:289-293.

Landim-Alvarenga FCL (2006b) Parto Normal In.: Nereu, CP, Alvarenga FCL **Obstetrícia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara, cap.6, p. 82-96.

Landim-Alvarenga FCL (2006a) Reconhecimento Materno do Concepto e início da Placentação In.: Nereu CP, Alvarenga FCL **Obstetrícia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara, cap.2, p. 22-40.

Leiser R, Kaufmann P (1994) Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes** 102:122-134.

Lopate C (2008) Estimation of gestational age and assessment of canine fetal maturation using radiology and ultrasonography: A review. **Theriogenology** 70:97-402.

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

Mahaffey MB, Selcer BA, Cartee RE (1995) The reproductive system. In.: Cartee RE, Selcer BA, Hudson (Eds.) **Practical veterinary ultrasound**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 236-265.

Maronezi MC, Feliciano MAR, Vicente WRR (2019) Elastografia e ultrassonografia contrastada. In.: Feliciano MAR, Assis AR, Vicente WRR **Ultrassonografia em cães e gatos** (Eds.) São Paulo: Medvet, cap. 1, p. 33-55.

Mattoon JS, Nyland TG (2015) **Small Animal Diagnostic Ultrasound** (Eds.) St Louis: Elsevier.

Mcgeady TA, Quinn PJ, Fitzpatrick ES, Ryan MT (2006) Forms of Implantation and Placentation. In.: Mcgeady TA, Quinn PJ, Fitzpatrick ES, Ryan MT **Veterinary Embryology** (Eds.) **Veterinary Embryology**. Blackwell Publishing, cap. 10, p. 78-104.

Moore HI, Persaud TVN (2000) **Embriologia clínica** (Eds.) Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Oliveira ECS, Júnior APM (2006) Endocrinologia reprodutiva e controle da fertilidade da cadela. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 30:11-18.

Ophir J, Alam SK, Garra BS, Kallel F, Konofagou EE, Krouskop T, Merritt CR, Righetti R, Souchon R, Srinivasan S, Varghese T (2002) Elastography: Imaging the elastic properties of soft tissues with ultrasound. **Journal of Medical Ultrasonics** 29:155-171.

Prestes NC, Alvarenga FCL (2006) **Obstetrícia Veterinária**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: 23-40.

Priedkalns J, Leiser R (2012) Sistema reprodutivo da fêmea. In.: Eurell JA, Frappier BL **Histologia Veterinária de Dellman**. São Paulo: Manole, cap. 13, p. 256-278.

Raio I, Ghezzi F, Antonella C, Nelle M, Durig P, Schneider H (2004) The thick heterogeneous (jellylike) placenta: a strong predictor of adverse pregnancy outcome. **Prenatal Diagnosis** 24:182-188.

Schwartz M, Wang E, Parry S (2012) Two-dimensional sonographic placental measurements in the prediction of small for gestational age infants. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology** 40:674-679.

Serra EG, Guimarães KS (1996) Avaliação ultra-sonográfica da gestação na espécie canina. **Clínica Veterinária** 1:18-19.

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

Son CH, Jeong KA, Kim JH, Park IC, Kim SH, Lee CS (2001) Establishment of the prediction table of parturition day with ultrasonography in small pet dogs. **Journal of Veterinary Medical Science** 63:715-721.

Steinetz BG, Goldsmith IT, Lust G (1987) Plasma relaxin levels in pregnant and lactating dogs. **Biology of Reproduction** 37:719-725.

Toniollo GH, Vicente WRR (1993) Fisiopatologia do Puerpério. In: **Manual de Obstetrícia Veterinária**. 12:97-108, editora Varela, SP.

Veerbeek JH, Nikkels PG, Torrance HL, Gravesteyn J, Post uiterweer ED, Derks JB, Koenen SV, Visser GH, Van rijn BB, Franx A (2014) Placental pathology in early intrauterine growth restriction associated with maternal hypertension. **Placenta** 35:696-701.

Vejlsted M (2010) Comparative placentation. In.: Hyttel P, Sinowatz F, Vejlsted M **Essentials of domestic animal embryology**. Elsevier, cap. 9, p. 104-119.

Voorwald FA, Tiosso CF (2015) Puerpério. In.: Apparício M, Vicente WRR **Reprodução e Obstetrícia em Cães e Gatos**. MedVet, cap. 19, p. 219-225.

Yeager AE, Concannon PW (1990) Serial ultrasonographic appearance of postpartum uterine involution in beagle dogs. **Theriogenology** 38:523-535.

Yeager AE, Mohammed HO, Meyers-wallen V, Vannerson I, Concannon PW (1992) Ultrasonographic appearance of the uterus, placenta, fetus, and fetal membranes throughout accurately timed pregnancy in Beagles. **American Journal of Veterinary Research** 53:342-351.

CAPÍTULO 2 – Avaliação da elastografia ARFI e biometria placentária em cadelas¹

RESUMO

A rigidez placentária e a biometria de doze cadelas gestantes foram avaliadas por meio da ultrassonografia modo-B e elastografia Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI), realizada uma vez ao dia, desde o dia 15 da gestação até o parto. Foram utilizados softwares específicos (Virtual Touch Tissue Quantification® - VTTQ TM e Virtual Touch Tissue Imaging Quantification® - VTTIQ TM). Os valores dos resultados das variáveis foram correlacionados e modelos de regressão relacionados. A espessura placentária materno-fetal aumentou até o dia 63 de gestação ($P < 0,0001$; $R^2 = 0,91$), a materna aumentou até o dia 40 ($P = 0,0340$; $R^2 = 0,54$) e a fetal até o dia 50 ($P < 0,0001$; $R^2 = 0,83$). A velocidade da onda de cisalhamento (SWV) da área dorsal ($P < 0,0010$) foi maior que a lateral, que por sua vez foi maior ($P = 0,020$) que a ventral. A SWV da área dorsal, determinada pelo VTTQ TM, diminuiu do dia 21 ao dia 35 e aumentou no dia 56 da gestação ($P = 0,0291$; $R^2 = 0,4021$); A SWV lateral diminuiu do dia 24 ao dia 45 e aumentou até o parto ($P < 0,001$; $R^2 = 0,6055$). A SWV da área dorsal, determinada pelo VTTIQ TM, diminuiu do dia 21 ao dia 43 e depois aumentou no dia 60 da gestação ($P = 0,0016$; $R^2 = 0,5075$); e a SWV da ventral aumentou do dia 21 ao dia 23 e diminuiu até o parto ($P < 0,001$; $R^2 = 0,8055$). As alterações placentárias refletem adaptações gestacionais estruturais e bioquímicas e podem se tornar técnicas úteis para obstetrícia veterinária.

Palavras-chave: Biometria; Canino; Elastografia; Placentário; Ultrassonografia

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Animal Reproduction Science e encontra-se em avaliação para publicação.

1. Introdução

A placenta é o primeiro órgão fetal a se desenvolver e possui funções primordiais e críticas: permeia a implantação e estabelece uma interface para troca de nutrientes e gases na circulação materno-fetal, modificando os mediadores imunológicos locais, sistema cardiovascular e funções metabólicas (Cross, 2006). Nos carnívoros é classificada como zoonária, devido à disposição das vilosidades coriônicas (Júnior, 2015) e endotéliocorial pela conexão entre as vilosidades do córion fetal e o endotélio uterino (Johnston et al. 2001).

O primeiro estágio do desenvolvimento placentário é demarcado pela implantação embrionária que se inicia nas cadelas em torno do 18º dia após a ovulação (Chastant-Maillard et al. 2010), precedida pela eclosão do blastocisto, com modificações que se principiam no útero e no embrião, que incluem contato físico, após a dissolução da zona pelúcida, entre o trofoblasto e o endométrio (Landim-Alvarenga, 2006).

A biometria é uma técnica importante para analisar e monitorar morfometricamente o desenvolvimento e crescimento de estruturas gestacionais materna, embrionária e fetal, prever a idade gestacional do feto e a provável data do parto (Lopate, 2008; Miranda e Domingues, 2010), reduzindo a mortalidade pré-natal através do diagnóstico de distúrbios que podem afetar negativamente a gestação (Johnsen et al. 2008). Na medicina, a avaliação elastográfica da placenta foi realizada para caracterização da rigidez estrutural e identificação precoce de anomalias como: pré-eclâmpsia, descolamento placentário, parto prematuro espontâneo, retardo no crescimento intra-uterino e morte perinatal, que são as principais causas (cerca de 5% da população neonatal) de morbidade

e mortalidade materna e fetal (Gupta et al. 2008; Yu et al. 2008; Lindheimer et al. 2010).

Em medicina veterinária, há apenas um estudo que relata a aplicabilidade da elastografia na avaliação da placenta animal, utilizando murino como modelo experimental de restrição de crescimento intrauterino (Quibel et al. 2015), destacando a precariedade na descrição das características ultrassonográficas da estrutura uteroplacentária durante a gestação fisiológica ou patológica em diferentes espécies.

Os métodos de imagem desenvolvidos especificamente para avaliar a elasticidade dos tecidos são coletivamente referidos como elastografia, uma modalidade de imagem não invasiva, classificada com base na fonte da força que é exercida sobre os tecidos; como compressão manual, acoustic radiation force impulse (ARFI) e velocidade de cisalhamento em tempo real (VSR). Ademais, avaliações elastográficas podem ser realizadas utilizando a técnica qualitativa ou elastografia de força e a técnica quantitativa empregando ondas de compressão (Feliciano et al. 2015a). Em medicina veterinária, a técnica ultrassonográfica ARFI tem sido utilizada na detecção de diferentes tipos de alterações patológicas em baço e rins canino e felino, fígado canino, glândula prostática e testículos (Holdsworth et al. 2014; Feliciano et al. 2015b, 2015c; Garcia et al. 2015; Maronezi et al. 2015). Esta técnica tem a vantagem de ser repetível, objetiva, menos dependente do operador e promete ser método válido para avaliação de mudanças na estrutura placentária canina.

Com esses preceitos, hipotetiza-se que: i) a biometria placentária ao modo-B permite predição da idade gestacional; e ii) alterações na rigidez tecidual da estrutura placentária durante o desenvolvimento gestacional à elastografia. O

objetivo do presente estudo foi avaliar a biometria, determinar as características quantitativas elastográficas e os valores de referência para a SWV da estrutura placentária a partir do 15º dia de gestação até o parto em cadelas saudáveis. Hipotetizando que essa técnica não invasiva fornece informações úteis sobre o desenvolvimento placentário durante a gestação fisiológica canina e se tornará ferramenta para o diagnóstico de processos patológicos. Adicionalmente, também pode ser técnica útil na identificação de condições patológicas que podem alterar a rigidez tecidual e se desenvolver durante a gestação, período em que a restrição do crescimento uterino é uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade perinatal (Bernstein et al. 2000; Aucott et al. 2004). Espera-se que os resultados do presente estudo forneçam base para estudos futuros visando o diagnóstico e monitoramento precoces de cadelas com complicações gestacionais, reduzindo assim as perdas genéticas e econômicas de canis e criadores (Beccaglia, 2015).

2. Materiais e métodos

2.1 Aspectos éticos e animais

Todo procedimento experimental foi realizado com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” / UNESP, Câmpus de Jaboticabal, Brasil (protocolo nº 9.884/16). Doze cadelas braquicefálicas, primíparas ou múltíparas (peso corporal $10,5 \pm 3,3$ kg e idade de $2,56 \pm 0,89$ anos), clinicamente saudáveis (com base na avaliação do histórico clínico, exame geral, hematologia, bioquímico (ALT e creatinina) e glicemia), de diferentes raças (oito Buldogues Franceses, dois Pugs e dois Shih-

tzus) foram selecionados aleatoriamente para este estudo de acordo com os critérios de inclusão para criadores comerciais de cães. O tamanho amostral foi definido com o objetivo de avaliar 24 unidades placentárias, o que permitiu atingir um poder estatístico de pelo menos 85%, conforme resultados obtidos por estudo prévio que avaliou a rigidez da estrutura placentária em mulheres com gestação fisiológica (Sugitani et al. 2013).

2.2 Protocolo experimental

2.2.1 Inseminação artificial

Os proprietários dos canis foram treinados para detectar os primeiros sinais de proestro, subsequentemente, a fase cíclica ovariana foi confirmada pela observação dos sinais de estro (ou seja, receptividade sexual) e por citologia vaginal (detecção de células superficiais anucleadas em esfregaços (> 80%)) (Socha et al. 2012). Após confirmação estral todos os animais foram submetidos à inseminação artificial intravaginal (IAIV) com sêmen fresco, a cada 48 horas por três dias consecutivos (Jacomini et al. 2006).

2.2.2 Avaliação ultrassonográfica ao modo-B

A detecção ultrassonográfica gestacional foi realizada com a utilização do aparelho ultrassonográfico Acuson S2000™ (Siemens®, Munique, Alemanha) equipado com transdutor linear de 9,0 MHz, duas semanas após a primeira IA (inseminação artificial), conforme descrito por estudo anterior de Feliciano et al. (2007). Para execução dos exames ultrassonográficos, uma ampla tricotomia da região abdominal foi previamente efetuada. O transdutor foi posicionado na região abdominal caudal e todas as configurações ajustáveis do dispositivo

ultrassonográfico (profundidade, ganho, índice mecânico e zonas focais) foram otimizadas e inalteradas durante todo o período do estudo. Todos os exames ultrassonográficos foram realizados por um único operador experiente (5 anos) com o objetivo de reduzir o tempo de avaliação e o estresse sofrido pelas gestantes e verificar consistentemente o desenvolvimento adequado dos conceptos e sua idade gestacional (Yeager et al. 1992; Socha et al. 2012; Simões et al. 2018).

Considerando o período variável de gestação em cães (entre 57 a 63 dias) (Concannon et al., 1983), o dia após a primeira inseminação foi considerado o primeiro dia de gestação neste estudo. As avaliações de espessura (mm) dos tecidos da estrutura materno-fetal da placenta foram determinadas uma vez ao dia, a partir do dia 15 de gestação e os tecidos maternos e fetais individuais, desde o dia 21 de gestação até o parto (Figura 1). Para avaliar consistentemente a mesma área da placenta em cada animal, houve padronização da avaliação de duas placentas caudais (uma de cada corno uterino).

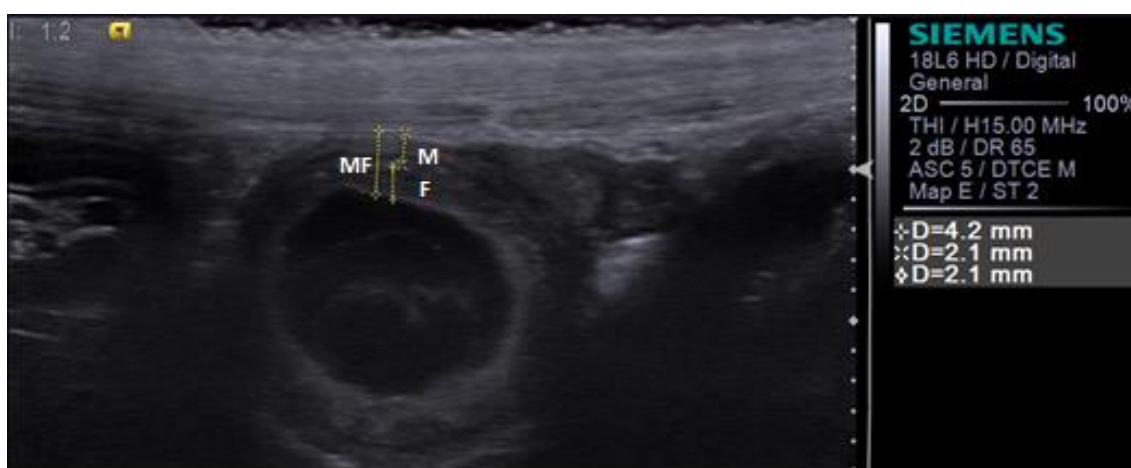


Figura 1. Imagem ultrassonográfica de alta resolução em seção longitudinal da estrutura placentária (unidade materna (M), fetal (F) e materno-fetal (MF)) em uma cadela no dia 31 de gestação.

2.2.3 Avaliação da elastografia ARFI

Imediatamente após o exame ultrassonográfico modo-B, a elastografia quantitativa (ARFI) da estrutura placentária (dorsal, lateral e ventral) foi obtida através de dois softwares comerciais que fornecem a SWV correspondente à rigidez dos tecidos: VTTQ[™] (Virtual Touch[™] Tissue Quantification; Siemens®, Alemanha) e VTTIQ[™] (Virtual Touch Tissue[™] Imaging Quantification; técnica 2D-SWE, Siemens®, Alemanha). Cada procedimento foi realizado uma vez ao dia, desde o dia 21 de gestação até o parto. Valores para variáveis elastográficas quantitativas em tempo real das velocidades das ondas de cisalhamento (SWV; m/s) dos tecidos foram obtidos utilizando caliper eletrônico com dimensões fixas (VTTQ[™]; 5 x 5 mm; Figura 2) e (VTTIQ[™]; 1 x 1 mm; Figura 3) posicionado dentro do parênquima de cada órgão em três locais diferentes (cranial, caudal e central), com profundidade variando de 5 a 20 mm.

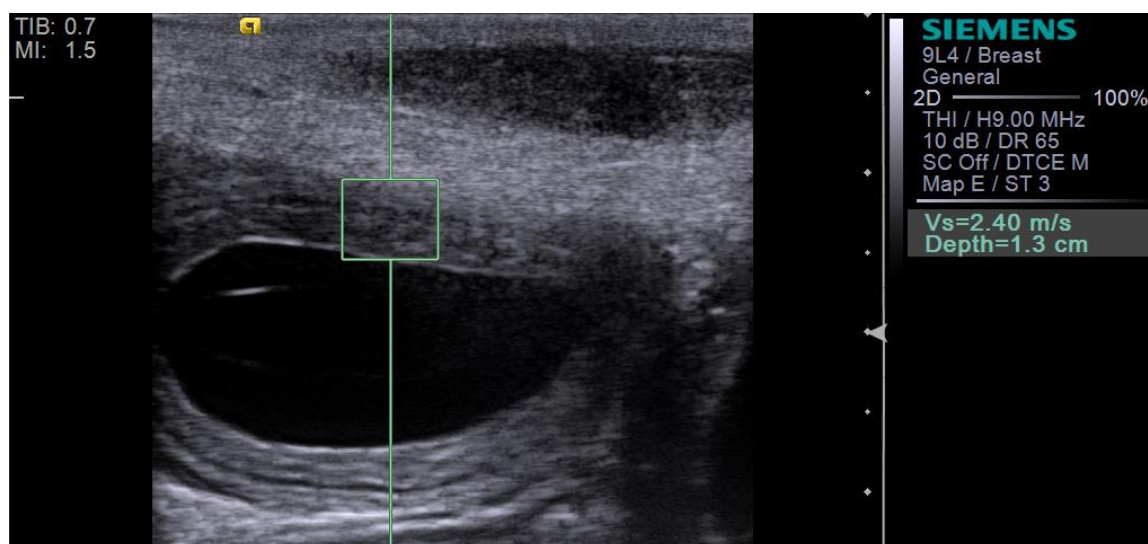


Figura 2. Imagem da elastografia quantitativa ARFI VTTQ[™] em seção longitudinal da área dorsal da placenta canina (caliper verde) no dia 40 de gestação (SWV = 2,40 m/s, profundidade = 1,3 cm).

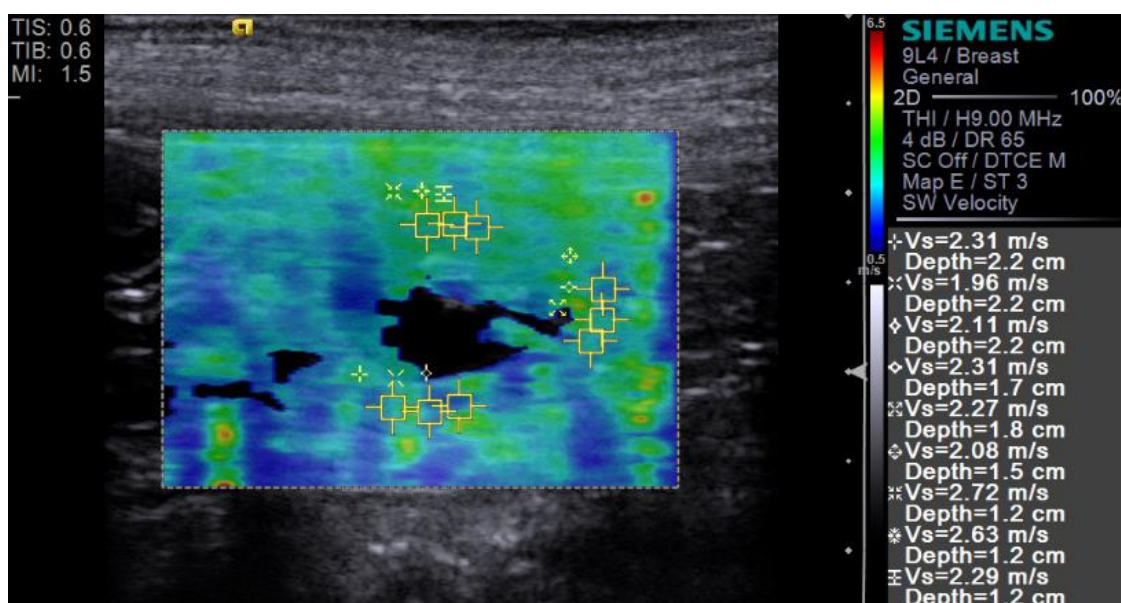


Figura 3. Imagem da elastografia quantitativa ARFI VTTIQ TM em seção longitudinal da placenta dorsal, lateral e ventral canina no dia 25 de gestação.

2.2.4 Escore apgar

Após o parto, todos os neonatos foram avaliados clinicamente pelo escore Apgar (0-10; 0, 5 e 60 min pós-parto) quantificando temperatura corporal (TC), frequência cardíaca (FC), esforço respiratório (FR), coloração mucosa gengival, tônus muscular, irritabilidade reflexa e vocalização (Silva et al. 2008). O acompanhamento do desenvolvimento morfofisiológico dos filhotes foi verificado semanalmente por meio de exames clínicos até o dia 60 pós-parto, quando os filhotes foram separados da mãe.

2.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico R® (R Foundation for Statistical Computing; Viena, Áustria), empregando delineamento

experimental em blocos (cadelas), com parcelas subdivididas no tempo (dias gestacionais). A normalidade residual (teste de Shapiro) e a homocedasticidade das variâncias (teste de Barlett) foram previamente testadas. A variação entre as medidas das três áreas de interesse em cada área da estrutura placentária foi estudada pelo teste de concordância de Bland-Altman. Médias da SWV e espessura placentária foram comparadas entre as áreas avaliadas e os dias gestacionais pela análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas. Para os parâmetros que resultaram significativos no teste ANOVA foram testados os ajustes nos modelos de regressão matemática (linear, quadrático e cúbico) ou contrastes ortogonais. A significância estatística foi estabelecida em 95% (valor $P < 0,05$).

3. Resultados

Todos os animais apresentaram gestação normal e não procederam anormalidades aparentes no desenvolvimento fetal ou placentário em exames pré ou pós-parto. Nenhum dos neonatos apresentou desconforto respiratório após o nascimento e o escore Apgar foi > 7 (Mediana $\pm$ IQR: $9 \pm 1,5$ em 0 min; $10 \pm 1,5$ em 5 min e $10 \pm 0,5$ em 60 min após o nascimento) durante a primeira hora de vida. A ultrassonografia modo-B e a ARFI foram realizadas sem dificuldades e não causaram alterações morfofisiológicas nos filhotes durante os primeiros 60 dias após o parto.

A espessura placentária materno-fetal ($5,59 \pm 0,83$ mm) mensurada a partir do dia 15 de gestação ao parto variou significativamente com o avanço da gestação ($P < 0,0001$); com aumento gradual do seu tamanho até o dia 63,

comportamento explicado por modelo de regressão linear ($P < 0,0001$; $R^2 = 0,91$); sendo observada variação após esse período.

A espessura placentária materna ($2,20 \pm 0,55$ mm), mensurada do dia 21 de gestação ao parto (Figura 1) aumentou significativamente com o avanço da gestação ($P < 0,0001$), de forma gradativa do dia 21 ao 40 e com posterior estabilização, comportamento explicado por modelo de regressão cúbica ($P = 0,0340$; $R^2 = 0,54$). A espessura placentária fetal ($3,40 \pm 0,63$ mm) mensurada a partir do dia 21 de gestação ao parto também variou com o progresso da gestação ($P < 0,0001$), com aumento gradual até o dia 50 e seu efeito é explicado por modelo de regressão linear ($P < 0,0001$; $R^2 = 0,83$; Figura 4).

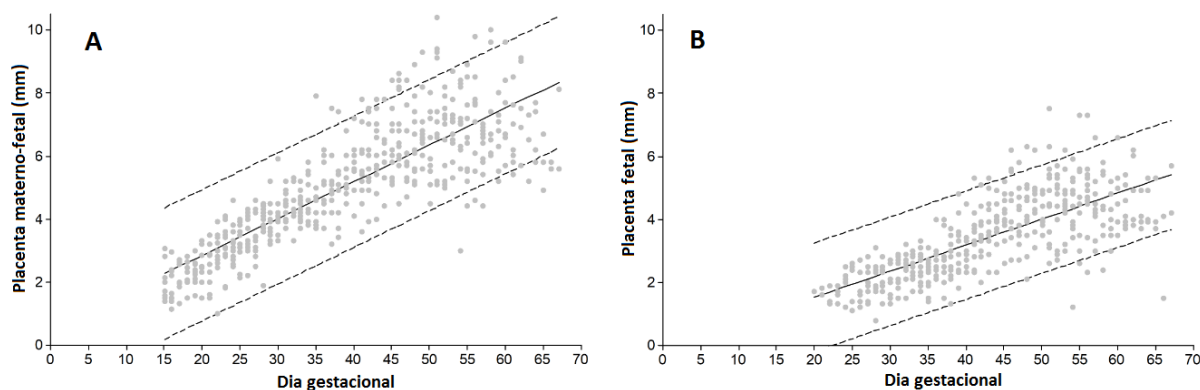


Figura 4. Representação gráfica da espessura materno-fetal da placenta (A) e fetal (B) (Y) durante o período fisiológico gestacional (X) em cadelas braquicefálicas. A linha contínua corresponde ao modelo de regressão (espessura materno-fetal (mm) = $0,12 \times \text{dia gestacional} + 0,52$; espessura fetal (mm) = $0,083 \times \text{dia gestacional} - 0,13$) adaptada a cada variável e os pontos indicam o intervalo de confiança de 95%.

Na avaliação da rigidez tecidual pela técnica elastográfica quantitativa VTTQTM (Figura 2), a SWV não apresentou variação intra-observações ($P =$

0,6291) e foram consideradas similares por apresentarem variações muito baixas ($0,30 \pm 0,20$ m/s). Entre as duas placentas analisadas em cada uma das cadelas gestantes também não houve variações na SWV ($P = 0,2023$).

Comparando as áreas placentárias, a média da SWV pelo VTTQTM da área dorsal ($2,62 \pm 0,63$ m/s) foi maior ($P < 0,0010$) que a lateral ($1,68 \pm 0,53$ m/s) e esta maior ($P = 0,020$) do que ventral ($1,50 \pm 1,37$ m/s). A SWV da área dorsal (Figura 5) variou durante o período gestacional ($P = 0,0052$), variação explicada pelo modelo de regressão cúbica ($P = 0,0291$; $R^2 = 0,40219$), em que os valores diminuíram do dia 21 ao 35, subsequentemente se elevaram até o dia 56 e depois estabilizaram. A SWV da área lateral também variou ($P < 0,001$), variação explicada por modelo de regressão quadrático ($P < 0,001$; $R^2 = 0,6055$), onde este parâmetro diminuiu gradualmente do dia 24 ao 45 e então aumentou gradualmente até o momento do parto. Finalmente, a SWV placentária da área ventral não se alterou durante o período gestacional ($P = 0,9611$).

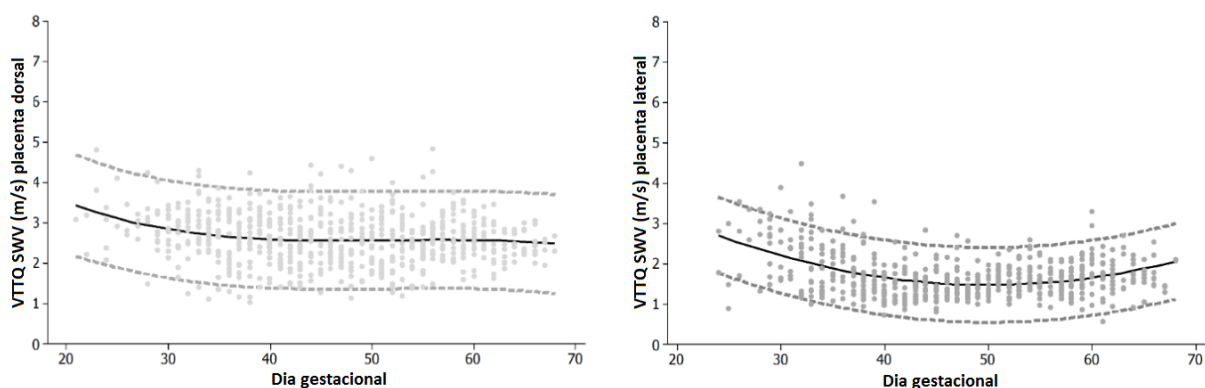


Figura 5. Representação gráfica da velocidade de onda de cisalhamento (SWV; m/s) das áreas dorsal e lateral da placenta usando a técnica quantitativa elastográfica VTTQTM durante o período fisiológico gestacional em 12 cadelas braquicefálicas.

Na avaliação da rigidez tecidual pela técnica elastográfica quantitativa VTTIQTM (Figura 3), a SWV não apresentou variação intra-observações ($P = 0,4774$) e foram consideradas similares por apresentarem variações muito baixas ($0,02 \pm 0,52$ m/s). Entre as duas placentas analisadas em cada uma das cadelas gestantes, também não houve variações na SWV ($P = 0,6570$).

Comparando as áreas placentárias, a média da SWV pela VTTIQTM da área dorsal ($2,60 \pm 0,44$ m/s) foi maior ($P < 0,001$) que a lateral ($2,33 \pm 0,56$ m/s) e esta maior ($P < 0,001$) que a ventral ($1,66 \pm 0,66$ m/s). A SWV da área dorsal (Figura 6) variou durante o período gestacional ($P < 0,0010$), variação explicada pelo modelo de regressão cúbica ($P = 0,0016$; $R^2 = 0,5075$), em que os valores diminuíram do dia 21 ao 43, subsequentemente se elevaram até o dia 60 e depois estabilizaram. A SWV da área ventral também variou ($P < 0,001$) variação explicada por modelo de regressão quadrático ($P < 0,001$; $R^2 = 0,8055$), onde este parâmetro gradualmente aumentou do dia 21 ao 23 de gestação e então diminuiu gradualmente até o momento do parto. Finalmente, a SWV placentária da área lateral não se alterou durante o período gestacional ($P = 0,1092$).

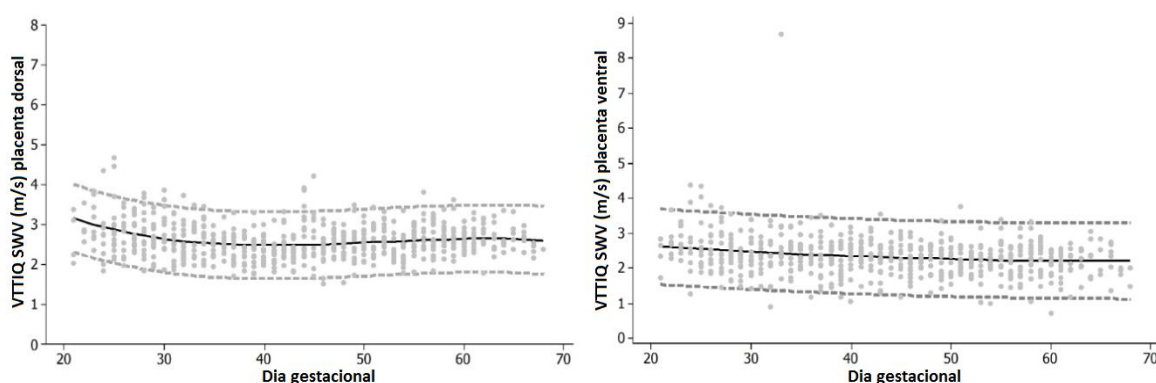


Figura 6. Representação gráfica da velocidade de onda de cisalhamento (SWV; m/s) das áreas dorsal e ventral placentária da placenta determinada pela técnica quantitativa elastográfica VTTIQTM durante o período gestacional em 12 cadelas braquicefálicas.

A SWV avaliada pelas técnicas VTTQ[™] e VTTIQ[™] apresentou correlação positiva ($P < 0,0001$) para cada uma das áreas dorsal, ventral e lateral ($R = 0,261, 0,626$ e $0,460$, respectivamente) e apenas pequenas variações foram observadas quando comparadas ($- 0,08 \pm 0,62, - 0,07 \pm 0,026, 0,60 \pm 0,79$ m / s, respectivamente).

4. Discussão

Com base nos resultados do presente estudo, a implementação da ultrassonografia modo-B e ARFI placentária de cadelas braquicefálicas, realizadas uma vez ao dia do dia 15 de gestação à parturição, foi aplicável e não causou nenhuma alteração clínica evidente na viabilidade e saúde materna, fetal ou neonatal. Sendo consistente com assertivas realizadas por estudos elastográficos em humanos (Sugitani et al. 2013; Karaman et al. 2016), babuínos (Quarello et al. 2016) e biométricos em cadelas (Maldonado et al. 2012).

O aumento registrado na espessura placentária (mm) materna, fetal e materno-fetal pela ultrassonografia modo-B em cães parece refletir as alterações que ocorrem na histologia das áreas placentárias do útero associada a um crescimento mais rápido durante o pré-natal, após o implante (Dantzer e Leiser, 2012). As determinações da espessura placentária materno-fetal ($5,59 \pm 0,83$ mm) também permitiram prever a idade gestacional, corroborando os resultados de estudo anterior (Maldonado et al., 2012) em que houve avaliação de diferentes raças e tamanhos de cadelas (pequenas, médias e grandes) e definição de uma espessura placentária média de 0,58 cm correspondente aos dias (dias 30,5, 35,2, 46 e 56,3) de gestação. Cada cão foi avaliado uma vez a partir da terceira semana gestacional, enquanto no presente estudo cada animal

foi avaliado diariamente, a partir do dia 15 após a primeira inseminação artificial até o parto, e apenas raças braquicefálicas de cães foram usadas como espécimes para o estudo. Esses resultados também corroboram os achados de Silva et al. (2007) em raça boxer em um estudo que houve correlação positiva entre os valores de espessura placentária e dias de gestação com $R^2 = 0,91$, semelhante aos resultados do presente estudo.

Comparando a espessura individual materna e fetal, a fetal ($3,40 \pm 0,63$ mm) foi maior que a materna ($2,20 \pm 0,55$ mm), sendo o aumento gradual e constante até o segundo trimestre gestacional posteriormente estabilizando a espessura placentária; no entanto, houve avaliações limitadas em estudos anteriores. Assim como observado em humanos (Schwartz et al., 2012), a mensuração da espessura placentária pode constituir como marcador clínico importante na predição de recém-nascidos afetados pela restrição de fluxo sanguíneo uteroplacentário em cães.

Placentas heterogêneas e espessas são condição fortemente associada à complicações maternas, fetais e neonatais e desponta como processo compensatório causado por subdesenvolvimento da circulação uteroplacentária (Raio et al. 2004), calcificação placentária (Maldonado et al. 2012), sinal precoce de hidropsia fetal, diabetes materno descontrolado ou infecção congênita (Kuhlmann e Warsof, 1996).

A placenta é um dos mais importantes órgãos parenquimatosos na obstretrícia e são limitados os estudos sobre sua elasticidade. Sugitani et al. (2013) foram os primeiros pesquisadores a avaliarem o tecido placentário *ex vivo* em mulheres gestantes com restrição de crescimento fetal e em que houve identificação de aumento na rigidez placentária em comparação ao grupo

controle saudável. Karaman et al. (2016) também avaliaram a elasticidade da placenta in vivo usando a técnica ARFI em gestantes hipertensas pré-eclâmpicas e normais, concluindo que essa abordagem diagnóstica permite avaliações precisas na detecção dessas complicações.

O presente estudo é o primeiro a avaliar a cronologia da elasticidade fisiológica placentária em cães, definindo padrões placentários normais para cadelas braquicefálicas, com o preceito de que essas anormalidades podem ser fator importante na morbimortalidade fetal devido à sua importância no desenvolvimento fetal e crescimento (Bowman e Zennedy, 2014). Estudos fisiopatológicos, portanto, são extremamente importantes na validação desse parâmetro diagnóstico em diferentes espécies. Os resultados de alguns estudos indicam que existem possíveis efeitos adversos fetais a longo prazo da ultrassonografia, como a teratogênese induzida termicamente devido ao aumento da temperatura do tecido, associada à ausência de perfusão vascular fetal durante o início da gravidez (Abramowicz et al., 2008). No presente estudo, no entanto, não foram observadas malformações, mesmo com a avaliação diária por essa técnica.

A elastografia ARFI foi realizada sem desconforto para as cadelas gestantes e não houve evidências de alterações nos fatores avaliados como resultado do uso dessa técnica, considerando-se abordagem segura e não invasiva. Observações semelhantes de Tabaru et al. (2012) em estudo sobre os efeitos biológicos da ultrassonografia na avaliação fetal. Esses achados foram verificados por Sugitani et al. (2013) em mulheres que relataram que, microscopicamente, não houve alterações estruturais, térmicas ou mecânicas nos tecidos estudados. A elastografia ARFI também foi eficaz devido à facilidade

de aplicabilidade e reprodutibilidade, ou seja, qualquer operador deve ser capaz de obter a mesma qualidade de imagem sem dificuldade. Não houve diferença entre medidas repetidas, mesmo com interferência profunda na SWV mensurada, consistente com os resultados de Ohmaru et al. (2015) que avaliaram o segundo e terceiro período gestacional em mulheres.

Li et al. (2012) relataram que não houve diferença entre as bordas e as áreas centrais da placenta em termos de valores de elasticidade placentária no terceiro trimestre da gestação fisiológica em humanos. A SWV da área dorsal que corresponde à área da borda livre da unidade placentária materno-fetal foi avaliada usando os dois softwares para distinguir função tecidual bem definida durante o processo gestacional, semelhante ao relatado em mulheres por Ohmaru et al. (2015). Os resultados indicaram que, embora os valores de SWV para as avaliações da placenta não se correlacionassem com a semana de gestação, no entanto, aumentou gradualmente durante a gravidez. Além disso, no terceiro trimestre de gestação, os resultados das avaliações histológicas, indicaram incremento da expressão de fibras de colágeno e presença de fibrose. Essas condições podem aumentar a rigidez do tecido; e fatores adicionais, como alterações inflamatórias que poderiam resultar de disfunção vascular associada à hipertensão gestacional e / ou infarto, não puderam ser excluídos; no entanto, complicações não foram detectadas durante o período de observação.

Os valores de SWV para a área ventral usando o software VTTQ™ que se refere à área de inserção do cordão umbilical e a área lateral que corresponde à área de borda livre da unidade placentária com o uso do software VTTIQ™ não foram alterados. Até onde sabemos, não há relatos anteriores que permitam comparar o atual com os resultados anteriores. Portanto, considera-se

aconselhável avaliar a SWV da área dorsal usando qualquer um dos tipos de software utilizados e descritos para a realização do presente estudo.

Na medicina veterinária, os resultados do estudo de Quarello et al. (2015a), em que houve avaliação da elasticidade placentária em babuíños no primeiro, segundo e terceiro trimestres gestacionais e avaliação do SWV, pode ser explicada por meio de modelo de regressão quadrática com $R^2 = 0,196$ durante a gestação. Houve resultados semelhantes no estudo anterior aos do presente estudo para a área de borda livre da placenta. No entanto, os resultados do presente indicaram que houve maior coeficiente de determinação $R^2 = 0,60$, devido ao maior tamanho da amostra e avaliação repetida em intervalos regulares nos mesmos animais. Os resultados indicam que as abordagens utilizadas são promissoras para avaliações fisiopatológicas em estudos futuros.

É importante enfatizar e reconhecer algumas limitações do presente estudo. Todos os fetos nasceram saudáveis; as indicações para cesariana foram baseadas na detecção ultrassonográfica de alterações na frequência cardíaca fetal (Gil et al., 2014a). O pequeno tamanho da amostra pode ser considerado fator limitante deste estudo, no entanto, é consistente com a metodologia utilizada por Gil et al. (2014, 2015a, 2015b) em estudos anteriores em que havia determinação de valores para diversas variáveis clínicas que são comumente usadas como valores de referência para gestações em cães.

Além disso, os resultados do presente estudo podem ter sido afetados por movimentos peristálticos ocorridos em cadelas gestantes, variabilidade na profundidade de órgãos fetais, movimentos fetais, sombreamento acústico gerado por costelas fetais e proporções de áreas de interesse avaliadas. Essas limitações da técnica de imagem foram descritas anteriormente por Quarello et

al. (2015b) e Simões et al. (2018) e pode afetar as relações entre as características elastográficas do tecido placentário.

5. Conclusão

A avaliação biométrica e elastográfica da placenta canina desde o dia 15 da gestação até o parto foi possível e não causou alterações aparentes na viabilidade materna, fetal ou neonatal. Os padrões encontrados no espessamento placentário e na avaliação da SWV placentária refletem as adaptações estruturais e bioquímicas que ocorrem durante os estágios da gestação e podem se tornar uma técnica útil na obstetrícia clínica. A técnica e os valores elucidados neste estudo fornecem referência para análises biométricas e elastográficas de tecidos gestacionais normais e base promissora para futuros estudos fisiopatológicos em diferentes espécies de interesse veterinário.

Referências

- Abramowicz, J.S., Barnett, S.B., Duck, F.A., Edmonds, P.D., Hynynen, K.H., Ziskin, M.C., 2008. Fetal Thermal Effects of Diagnostic Ultrasound. *J. Ultrasound. Med.* 27, 541-559. <https://doi.org/10.7863/jum.2008.27.4.541>.
- Aucott, S.W., Donohue, P.K., Northington, F.J., 2004. Increased morbidity in severe early intrauterine growth restriction. *J. Perinatol.* 24, 435-440. <https://doi.org/10.1038/sj.jp.7211116>.
- Beccaglia, M., 2015. Determination of gestational time and prediction of parturition: an update. In: EVSSAR CONGRESS. Congress Proceedings Book Hannover 20-25. <https://doi.org/10.1111/rda.12782>.
- Beccaglia, M., Alonge, S., Trovo', C., Luvoni, G.C., 2016. Determination of gestational time and prediction of parturition in dogs and cats: an update. *Reprod. Dom. Anim.* 51, 12-17. <https://doi.org/10.1111/rda.12782>.
- Bernstein, I.M., Horbar, J.D., Badger, G.J., Ohlsson, A., Golan, A., 2000. Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 182, 198-206.
- Bowman, Z.S., Kennedy, A.M., 2014. Sonographic appearance of the placenta. *Curr. Probl. Diagn. Radiol.* 43, 356-373. <https://doi.org/10.1067/j.cpradiol.2014.05.006>.
- Chastant-Maillard, S., Chebrou, M., Thoumire, S., Saint-Dizierb, M., Chodkiewicz, M., Reynaud, K., 2010. Embryo biotechnology in the dog: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 1049-1056. <https://doi.org/10.1071/RD09270>.

- Concannon, P.W., Whaley, S., Lein, D., Wissler, R., 1983. Canine gestation length: variation related to time of mating and fertile life of sperm. *Am. J. Vet. Res.* 44, 1819-1821.
- Cross, C.C., 2006. Placental function in development and disease. *Reprod. Fertil. Dev.* 18, 71-76.
- Dantzer, V., Leiser, R., 2012. Placentação, in: Eurell, J.A., Frappier, B.L. (Eds.), *Histologia Veterinária de Dellman*. Manole, São Paulo, pp. 279-297.
- Feliciano, M.A.R., Garcia, P.H.S., Vicente, W.R.R., 2015a. Introdução à Ultrassonografia, in: Feliciano, M.A.R., Canola, J.C., Vicente, W.R.R. (Eds.), *Diagnóstico por imagem em cães e gatos*. MedVet, São Paulo, pp. 54-77.
- Feliciano, M.A.R., Maronezi, M.C., Crivellenti, L.Z., Crivellenti, S.B., Simões, A.P.R., Brito, M.B.S., Garcia, P.H.S., Vicente, W.R.R., 2015b. Acoustic radiation force impulse (ARFI) elastography of the spleen in healthy adult cats – a preliminary study. *J. Small. Anim. Pract.* 56, 180-183. <https://doi.org/10.1111/jsap.12307>.
- Feliciano, M.A.R., Maronezi, M.C., Pavan, L., Castanheira, T.L., Simões, A.P.R., Carvalho, C.F., Canola, J.C., Vicente, W.R.R., 2014. ARFI elastography as complementary diagnostic method of mammary neoplasm in female dogs – preliminary results. *J. Small. Anim. Pract.* 55, 500-508. <https://doi.org/10.1111/jsap.12256>.
- Feliciano, M.A.R., Maronezi, M.C., Simões, A.P.R., Uscategui, R.R., Maciel, G.S., Carvalho, C.F., Canola, J.C., Vicente, W.R.R., 2015c. Acoustic radiation force impulse elastography of prostate and testes of healthy dogs: preliminary results. *J. Small. Anim. Pract.* 56, 20-324. <https://doi.org/10.1111/jsap.12323>.

- Feliciano, M.A.R., Muzzi, L.A.L., Leite, C.A.L., Junqueira, M.A., 2007. Two-dimensional conventional, high resolution two-dimensional and three-dimensional ultrasonography in the evaluation of pregnant bitch. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59, 1333-1337.
- Feliciano, M.A.R., Assis, A.R., 2019. Sistema Reprodutor Feminino, in: Feliciano, M.A.R., Assis, A.R., Vicente, W.R.R. (Eds.), *Ultrassonografia em cães e gatos*. MedVet, São Paulo, pp. 70-134.
- Garcia, P.H.S., Feliciano, M.A.R., Carvalho, C.F., Crivellenti, L.Z., Maronezi, M.C., Almeida, V.T., Uscategui, R.R., Vicente, W.R.R., 2015. Acoustic radiation force impulse (ARFI) elastography of kidneys in healthy adult cats: preliminary results. *J. Small. Anim. Pract.* 56, 505-509. <https://doi.org/10.1111/jsap.12373>.
- Gil, E.M.U., Garcia, D.A.A., Froes, T. R., 2015a. In utero development of the fetal intestine: Sonographic evaluation and correlation with gestational age and fetal maturity in dogs. *Theriogenology* 84, 681-686. <http://doi:10.1016/j.theriogenology.2015.04.030>.
- Gil, E.M.U., Garcia, D.A.A., Giannico, A.T., Froes, T.R., 2014. Canine fetal heart rate: Do accelerations or decelerations predict the parturition day in bitches? *Theriogenology* 82, 933-941. <https://doi:10.1016/j.theriogenology.2014.04.025>.
- Gil, E.M.U., Garcia, D.A.A., Giannico, A.T., Froes, T.R., 2015b. Use of B-mode ultrasonography for fetal sex determination. *Theriogenology* 82, 875-879. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.020>.

- Gupta, L.M., Gaston, L., Chauhan, S.P., 2008. Detection of fetal growth restriction with preterm severe preeclampsia: experience at two tertiary centers. *Am. J. Perinatol.* 25, 247-249.
- Holdsworth, A., Bradley, K., Birch, S., Browne, W.J., Barberet, V., 2014. Elastography of the normal canine liver, spleen and kidneys. *Vet. Radiol. Ultrasound.* 55, 620-627. <https://doi.org/10.1111/vru.12169>.
- Jacomini, J.O., Cunha, G.N., Moreira, C.F., 2006. Use of the artificial insemination in Bulldogs bitches. *Vet. Not.* 12, 141-144.
- Johnsen, S.L., Wilsgaard, T., Rasmussen, S., Hanson, M.A., Godfrey, K.M., Kiserud, T., 2008. Fetal size in the second trimester is associated with the duration of pregnancy, small fetuses having longer pregnancies. *BMC Pregnancy Childbirth* 8, 1-7. <https://doi.org/10.1186/1471-2393-8-25>.
- Johnston, S.D., Root Kustritz, M.V., Olson, P.N.S., 2001. Breeding management and artificial insemination of the bitch, in: Kersey, R. (Eds.), *Canine and Feline Theriogenology*. Saunders Company, London, pp 41-67.
- Júnior, L.P.L., 2015. Placenta e placentação, in: Apparício, M.; Vicente, W.R.R. (Eds.), *Reprodução e Obstetrícia em cães e gatos*. MedVet, São Paulo, pp. 47-52.
- Karaman, E., Arslan, H., Çetin, O., Şahin, H.G., Bora, A., Yavuz, A., Elasan, S., Akbudak, I., 2016. Comparison of placental elasticity in normal and preeclamptic pregnant women by acoustic radiation force impulse elastosonography, *J. Obstet. Gynaecol.* 42, 1464-1470. <https://doi.org/10.1111/jog.13078>.

- Kiliç, F., Kayadibi, Y., Yüksel, M.A., Adaletli, I., Ustabasıoğlu, F.E., Öncül, M., Madazlı, R., Yılmaz, M.H., Mihmanlı, I., Kantarcı, F., 2015. Shear wave elastography of placenta: In vivo quantitation of placental elasticity in preeclampsia. *Diagn. Interv. Radiol.* 21, 202-207. <https://doi.org/10.5152/dir.2014.14338>.
- Kuhlmann, R.S., Warsof, S., 1996. Ultrasound of the placenta. *Clin. Obstet. Gynecol.* 39, 519-534.
- Landim-Alvarenga, F.C.L., 2006. Reconhecimento Materno do Concepto e início da Placentação, in: Nereu, C.P.; Alvarenga, F.C.L. *Obstetrícia Veterinária*. Guanabara, Rio de Janeiro, pp. 22-40.
- Li, W.J., Wei, Z.T., Yan, R.L., Zhang, Y.L., 2012. Detection of placenta elasticity modulus by quantitative real-time shear wave imaging. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 39, 470-473.
- Lindheimer, M.D., Taler, S.J., Cunningham, F.G., 2010. Hypertension in pregnancy. *J. Am. Soc. Hypertens.* 4, 68-78. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2010.03.002>.
- Lopate, C., 2008. Estimation of gestational age and assessment of canine fetal maturation using radiology and ultrasonography: A review. *Theriogenology* 70, 397-402. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.034>.
- Maldonado, A.L.L., Júnior, E.A., Mendonça, D.S., Nardozza, L.M.M., Moron, A.F., Ajzen, S.A., 2012. Ultrasound Determination of Gestational Age Using Placental Thickness in Female Dogs: An Experimental Study. *Vet. Med. Int.* pp. 1-6. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/850867>.

- Maronezi, M.C., Feliciano, M.A.R., Crivellenti, L.Z., Simões, A.P.R., Bartlewski, P.M., Gill, I., Canola, J.C., Vicente, W.R.R., 2015. Acoustic radiation force impulse elastography of the spleen in healthy dogs of different ages. *J. Small. Anim. Pract.* 56, 393-397. <https://doi.org/10.1111/jsap.12349>.
- Miranda, S.A., Domingues, S.F.S., 2010. Conceptus ecobiometry and triplex Doppler ultrasonography of uterine and umbilical arteries for assessment of fetal viability in dogs. *Theriogenology* 74, 608-617. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.03.008>.
- Ohmaru, T., Fujita, Y., Sugitani, M., Shimokawa, M., Fukushima, K., Kato K., 2015. Placental elasticity evaluation using virtual touch tissue quantification during pregnancy. *Placenta* 36, 915-920. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.06.008>.
- Quarello, E., Lacoste, R., Mancini, J., Melot-Dusseau, S., Gorincour, G., 2015a. Élastographie par ondes de cisaillement (shear waves) du placenta chez la babouine gestante. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 43, 200-204. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2015.01.004>.
- Quarello, E., Lacoste, R., Mancini, J., Dusseau, S.M., Gorincour, G., 2015b. Feasibility and reproducibility of ShearWave (TM) elastography of fetal baboon organs. *Prenat. Diag.* 35, 1112-1116. <https://doi.org/10.1002/pd.4655>.
- Quarello, E., Lacosted, R., Mancinie, J., Melot-Dusseau, S., Gorincour, G., 2016. ShearWave elastography of fetal lungs in pregnant baboons. *Diagn. Interv. Imaging.* 97, 605-610. <https://doi.org/10.1016/j.diii.2015.11.019>.

- Quibel, T., Deloison, B., Chammings, F., Chalouhi, G.E., Siauve, N., Alison, M., Bessi res, B., Gennisson, J.L., Clément, O., Salomon, L.J., 2015. Placental elastography in a murine intrauterine growth restriction model. *Prenat. Diagn.* 35, 1106-1111. <https://doi.org/10.1002/pd.4654>.
- Raio, L., Ghezzi, F., Antonella, C., Nelle, M., Durig, P., Schneider, H., 2004. The thick heterogeneous (jellylike) placenta: a strong predictor of adverse pregnancy outcome. *Prenat. Diagn.* 24, 182-188. <https://doi.org/10.1002/pd.828>.
- Schwartz, N., Wang, E., Parry, S., 2012. Two-dimensional sonographic placental measurements in the prediction of small for gestational age infants. *Ultrasound. Obstet. Gynecol.* 40, 674-679. <http://doi.org/10.1002/uog.11136>.
- Silva, L.C.G., 2008. Parâmetros clínicos, hemogasométricos e radiográficos para avaliação respiratória de neonatos caninos nascidos em eutocia ou cesariana eletiva. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, pp. 75f.
- Silva, M.R.C., Sterman, F.A., Almeida, A.H., 2007. Mensuração ultra-sonográfica das dimensões do crânio fetal em gestações normais em cadelas da raça boxer e sua relação com a idade gestacional. *Braz. J. Res. Anim. Sci.* 44, 25-29. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2007.26586>.
- Simões, A.P.R., Feliciano, M.A.R., Maronezi, M.C., Uscategui, R.A.R., Bartlewskid, P.M., Almeida, V.T., Oh, D., Silva, P.E.S., Silva L.C.G., Vicente, W.R.R., 2018. Elastographic and echotextural characteristics of foetal lungs and liver during the final 5 days of intrauterine development in dogs. *Anim. Reprod.* 197, 170-176. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.025>.

- Socha, P., Rudowska, M., Janowski, T., 2012. Effectiveness of determining the parturition date in bitches using the ultrasonographic fetometry as compared to hormonal and cytological methods. *Pol. J. Vet. Sci.* 15, 447-53.
- Sugitani, M., Fujita, Y., Yumoto, Y., Fukushima, K., Takeuchi, T., Shimokawa, M., Kato, K., 2013. A new method for measurement of placental elasticity: Acoustic radiation force impulse imaging. *Placenta* 34, 1009-1013. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.08.014>
- Tabaru, M., Yoshikawa, H., Azuma, T., Asami, R., Hashiba, K., 2012. Experimental study on temperature rise of acoustic radiation force elastography. *J. Med. Ultrasonics.* 39, 137-146. <https://doi.org/10.1007/s10396-012-0357-8>.
- Yeager, A.E., Mohammed, H.O., Meyers-Wallen, V., Vannerson, L., Concannon, P.W., 1992. Ultrasonographic appearance of the uterus, placenta, fetus, and fetal membranes throughout accurately timed pregnancy in beagles. *AM. J. Vet. Res.* 53, 342-351.
- Yu, C.K., Khouri, O., Onwudiwe, N., Spiliopoulos, Y., Nicolaides, K.H., 2008. Prediction of pre-eclampsia by uterine artery Doppler imaging: relationship to gestational age at delivery and small-for-gestational age. *Ultrasound. Obstet. Gynecol.* 31, 310-313. <https://doi.org/10.1002/uog.5252>.

CAPÍTULO 3 – Avaliação elastográfica e biométrica do útero pós-parto de cadelas submetidas à parto normal ou cesariana¹

“Ultrassonografia pós-parto em cadelas”

DOI: 10.1111/rda.13633

ORIGINAL ARTICLE

Reproduction in Domestic Animals WILEY

Quantitative ultrasound elastography and biometry of the bitch uterus in the early puerperium after vaginal delivery and caesarean section

Ana Paula Rodrigues Simões¹ | Marjory Cristina Maronezi¹ | Ricardo Andres Ramirez Uscategui² | Michelle Lopes Avante¹ | Beatriz Gasser¹ | Priscila Silva¹ | Letícia Pavan¹ | Giovanna Serpa Maciel¹ | Marina Emanoella Seruti Pelógia¹ | Wilter Ricardo Russo Vicente¹ | Marcus Antonio Rossi Feliciano^{1,3} 

Abstract: Elastography is an actual imaging method used to qualitatively and quantitatively evaluate the elastic properties of tissues. The aim of this study was to evaluate and compare uterine tissue biometry and stiffness during post-partum period in brachycephalic bitches (n = 12) after c-section (GCS; n = 8) or normal delivery (GNB; n = 4). These animals were evaluated daily by abdominal ultrasound from the day of delivery until the 10th day postpartum; measuring uterine diameter, myometrial and endometrial thickness (mm) and shear wave velocity (SWV; m/s), by B-mode and ARFI (acoustic radiation force impulse) elastography, respectively. Uterine diameter was higher (P = .012) in animals submitted to c-section (15.26 ± 4.73 mm) than in normal birth (12.53 ± 2.64 mm) during the first 7 days post-partum. Uterine thickness gradually involuted in both groups (P < .0001), the myometrium during the first 9 days (P = .005) and the endometrium during the first 6 days (P = .003). The myometrial and endometrial SWVs were similar between types of delivery (P = .7846 and .8273) and

presented a gradual increase ($P = .411$; $.0043$, respectively), during the first 10 day post-partum. It was concluded that bitches with normal delivery had smaller uterine thickness and faster puerperal involution than submitted to c-section, while uterine tissue stiffness was similar between delivery types and increased gradually during post-partum.

KEYWORDS: canine, echobiometry, pregnancy, ultrasonography

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico publicado na revista *Reproduction in Domestic Animals* 00:1-10, 2020.

1. INTRODUCTION

The post-partum or puerperium is characterized by physiological changes occurring after delivery. In this phase, the genital system progressively returns to pre-pregnancy condition and size and should be accompanied by adequate uterine tone for loci elimination and epithelial regeneration (Voorwald & Tiosso, 2015). At the normal puerperium, the bitches exhibit serous-bloody vaginal discharge for 1–6 weeks being this time considered, as the time of normal uterine involution (Feldman & Nelson, 1986). Although several studies have evaluated the puerperal period in female dogs (Barbosa et al., 2013; Ferri & Vicente, 2002; Ferri, Vicente, & Toniollo, 2003; Orfanou et al., 2009; Pharr & Post, 1992; Yeager & Concannon, 1990), in contrast to other mammalian species, the chronology of uterine involution has been poorly described and the uterine tissue characteristics as well its elasticity have not been characterized.

It is also important to highlight that puerperium is considered a very susceptible phase to uterine diseases, in which pathological conditions may develop (Feldman & Nelson, 1986) and for this reason, follow-up of uterine involution is essential to ensure future reproductive capacity, since failure to complete reproductive organs regression can lead to endometritis, metritis and placental retention (Hirt, Kneissl, & Teinfalt, 2000; Magata et al., 2013). In this sense, ultrasound is an important tool to evaluate canine reproductive system, being accurate, innocuous and providing real-time information of ovarian and uterine conditions, pregnancy, embryonic loss and puerperium (Davidson & Baker, 2009; England & Russo, 2006; Yilmaz & Uçar, 2012).

Elastography is a recent, non-invasive, fast and easy-to-perform ultrasound method for studying the elastic properties of tissue (Karaman et al.,

2016). Evaluations can be performed using the qualitative technique, compression or strain elastography designated 'static or semi-static' and the quantitative technique, sonoelastography and acoustic radiation force impulse (ARFI), which employs compression waves, as a 'dynamic' technique (Feliciano, Garcia, & Vicente, 2015; Maronezi, Feliciano, & Vicente, 2019). Gynaecology and obstetrics applications of elastography have recently been documented and studied, focused on identifying pathologies (Che et al., 2019; Stoelinga, Hehenkamp, Brolmann, & Huirne, 2014; Zhang et al., 2019). Furthermore, many of elastography studies in normal reproductive tissues are related to the cervix (Fuchs, Pomorski, & Zimmer, 2013; Lu et al., 2019; Muscatello et al., 2014; Thomas, 2006; Yamaguchi, Kamei, Kozuma, & Taketani, 2007). In medicine and veterinary medicine, limited studies have evaluated normal uterine tissue (Domanska et al., 2018; Manchanda et al., 2019; Tanaka et al., 2011), and no studies evaluated changes in uterine stiffness during physiological or pathological post-partum involution in animals. For this reason, aims that study may provide support for early diagnosis and therapeutic follow-up of post-partum uterine alterations, reducing genetic, zootechnical and economic losses, in the canine species and other phylogenetically close.

Hypothesizing that there are differences in uterine involution and stiffness during the puerperal phase in bitches that gave birth naturally and submitted to c-section. This study aims to evaluate, compare and describe the uterine dimensions changes evaluated by B-mode ultrasound and stiffness evaluated by elastography, in early puerperium in bitches following vaginal delivery and c-section.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1 Ethical aspects and animals

All experimental procedures were approved by the Animal Ethic and Welfare Committee (Univ. Estadual Paulista) protocol N°9.884/16. Twelve brachycephalic, primiparous or multiparous bitches (body weight 10.5 ± 3.3 kg and age of 2.56 ± 0.89 years), clinically healthy (after revision of clinical history, general examination, haematology and biochemical ALT, creatinine and blood glucose dosage, performed before inclusion in the study), of different brachycephalic breeds (eight French bulldogs, two Pugs and two Shih-tzus) owned by commercial dog breeders.

2.2 Experimental protocol

2.2.1 Gestational monitoring

These dogs were kept in the institution's experimental kennels with all necessary welfare conditions, and evaluated daily during pregnancy by ultrasound examination, using mathematical formulas to calculate gestational age (Gestational age (days) = $(6 \times \text{parietal diameter}) + (3 \times \text{abdominal diameter}) + 30$) (Beccaglia, Alonge, Trovo', & Luvoni, 2016) and days for parturition (biparietal diameter = $(\text{mm} - 25.11) / 0.61$ (small size) and biparietal diameter = $(\text{mm} - 29.18) / 0.7$ (medium size)) (Luvoni & Grioni, 2000). As soon as the days for parturition resulting < 10 , pregnant females were monitored daily to verify mucoid vulvar discharge, body temperature drop, maternal restlessness, foetal viability, uterine contractions, cervical dilation, pelvic and abdominal muscle relaxation as indicative signs of parturition (Johnston, 1986).

Once the parturition process started, the team followed the dogs all the time, providing all the support to achieve a natural and successful birth. However, bitches with non-productive uterine contractions for more than 2 hours, no progression or foetuses retention (Pretzer, 2008), were evaluated by abdominal ultrasound, and if a foetal heart rate was ≤ 160 beats per minute, characterizes foetal distress and dystocia, the caesarean section were performed as treatment (Gil, Garcia, Giannico, & Froes, 2014). Bitches that were able to give birth normally for the statistical analysis of this study were allocated to group GNB and those that needed c-section to group GCS.

2.2.2 C-section

For c-section, as pre-anesthetic medication metoclopramide (0.5 mg/ kg) was administered intramuscularly, anesthetic induction was performed with propofol at dose required for intubation, followed by epidural with lidocaine block (4 mg/kg) and subsequent isoflurane maintenance. Once the puppies are removed, tramadol (4 mg/kg) and benzylpenicillin (20.000 IU/kg) were administered intramuscularly, and as postoperative treatment, all animals were medicated with oral metamizole (25 mg/kg) every 12 hr for 5 days. The surgical technique was based on Fossum (2015) recommendation.

2.2.3 Apgar score

All neonates were clinically evaluated by Apgar score (0–10; at 0, 5- and 60-min post-partum) measuring body temperature (TC), heart rate (HR), respiratory effort (RF), gingival mucous colour, muscle tone, irritability reflexes

and vocalization (Silva, 2008). The morphophysiological development of these puppies was verified weekly by physical examinations until the 2 months old, when the pups were separated from their mother.

2.2.4 B-mode ultrasonography assessment

Once the delivery or anesthetic recovery was completed and after the pups were breastfed, the sonographic evaluation was started and performed daily at the same time until 10 days post-partum, using Acuson S2000™ ultrasound scanner (Siemens®), equipped with a 9.0 MHz linear transducer. To perform ultrasonographic examinations, a wide trichotomy of the abdominal region was previously realized, the transducer was positioned in the caudal abdominal region and all adjustable settings of the ultrasonic device (depth, gain, mechanical index and focal zones) were optimized and then left unchanged for the entire study period. These examinations were performed by a single experienced operator (5 years) to reduce evaluation time and stress endured by lactating animals.

At B-mode ultrasound, uterine tissue was measured in longitudinal section, assessing uterine diameter (UD; from serous to serous), uterine wall thickness (UWT; from serous to lumen), endometrium (EMT) and myometrium (MMT) thickness (Figure 1). The presence and characteristics of intraluminal content was also evaluated.

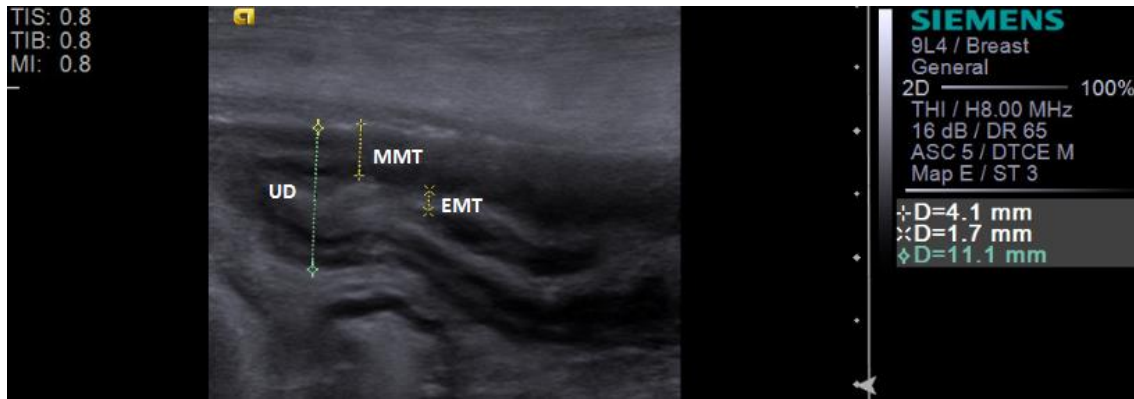


FIGURE 1 Ultrasonographic image in longitudinal section of the uterine structure (myometrium (MMT), endometrium (EMT) and uterine diameter (UD)) in a bitch on the 3rd puerperal day

2.2.5 ARFI elastography assessment

Following B-mode, quantitative elastography evaluated by ARFI was activated, and the uterine wall (myometrium and endometrium) stiffness as shear wave velocity (SWV m/s) was obtained using two specific software: (a) VTTQ™ (Virtual Touch™ Tissue Quantification; Siemens®) and (b) VTTIQ™ (Virtual Touch Tissue™ Imaging Quantification; 2D-SWE technique, Siemens®). Real-time quantitative elastography was obtained placing an electronic caliper with fixed dimensions (VTTQ™; 5 × 5 mm; Figure 2) and (VTTIQ™; 1 × 1 mm; Figure 3) within the parenchyma of each organ at three different locations (cranial, caudal and central), with the depth ranging from 0.5 to 2.0 cm.

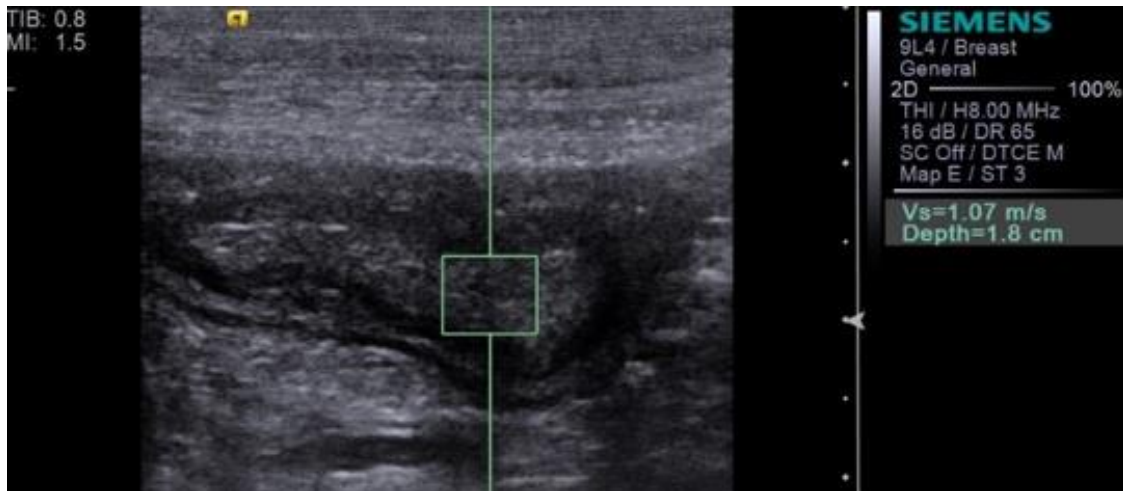


FIGURE 2 Ultrasonographic image of quantitative ARFI VTTQ™ elastography, in longitudinal section, of canine uterine endometrium (green caliper) on the 4th post-partum day

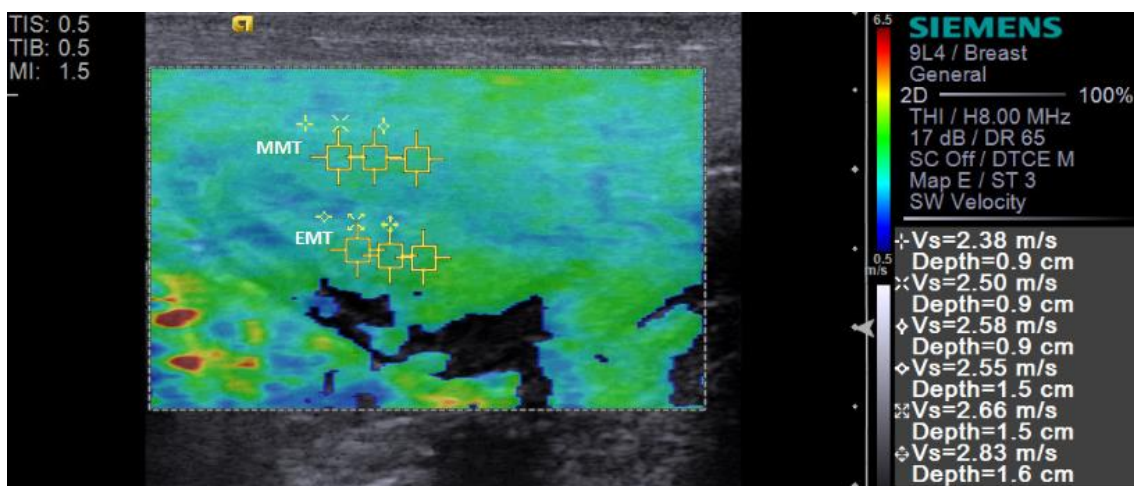


FIGURE 3 Ultrasonographic image of the quantitative ARFI VTTQ™ elastography, in longitudinal section, of the canine uterine myometrium (MMT) and endometrium (EMT) on the 9th postpartum day

2.3 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the statistical software R® (R Foundation for Statistical Computing), using a block (batches) randomized

experimental design, with parcels subdivided into time (post-partum days). Residual normality (Shapiro test) and homoscedasticity of variances (Bartlett's test) were previously tested. The variation between measurements of the three regions of interest in each uterine portion was studied by the Bland–Altman concordance test. SWV averages and uterine thickness were compared between the types of parturition evaluated and post-partum days by the analysis of variance (ANOVA) with repeated measures. The parameters that resulted significant at ANOVA test were tested by Tukey's post hoc and orthogonal contrasts (adjustments to mathematical regression models linear, quadratic and cubic). The relationship between the elastography techniques tested was studied by the Pearson correlation test. The statistical significance was set at 95% (p-value < .05).

3. RESULTS

All animals had normal gestations, were clinically healthy, and there were no abnormalities on the physical examination. Four bitches had normal birth (GNB; n = 4) and eight needed c-section (GCS; n = 8). A total of 70 fetuses were born (5.83 ± 1.33 puppies/litter); the mean litter size in French bulldog was 6.12 ± 1.24 , in Pug 4.50 ± 2.12 and in Shih-tzu 6.00 ± 0 . All puppies presented an Apgar scores >7 (9.0 ± 1.5 at 0 min; 10.0 ± 1.5 at 5 min and 10.0 ± 0.5 at 60 min after birth). B-mode and ARFI ultrasonography were performed without difficulty and did not cause morphophysiological alterations in the puppies evaluated during the first 60 days. All puppies from all litters were weaned at 45 days post-partum.

Mean uterine diameter during the first 7 days post-partum (DPP) was higher ($p = .012$) in bitches of c-section group (15.26 ± 4.73 mm) compared with normal delivery group (12.53 ± 2.64 mm); thus, the uterine involution was significant from 1st to 5th puerperal days in GNB and from 2nd to 7th days in GCS. In GNB, the uterine involution was very fast, and it was not possible calculate a regression formula to estimate uterine diameter over time. In the GCS, the involution was progressive and represents by a linear regression which allows to estimate the normal values ($UD = 19.3 - 0.8 \times DPP$; $p = .0001$ and $R^2 = 84\%$) (Figure 4, Table 1).

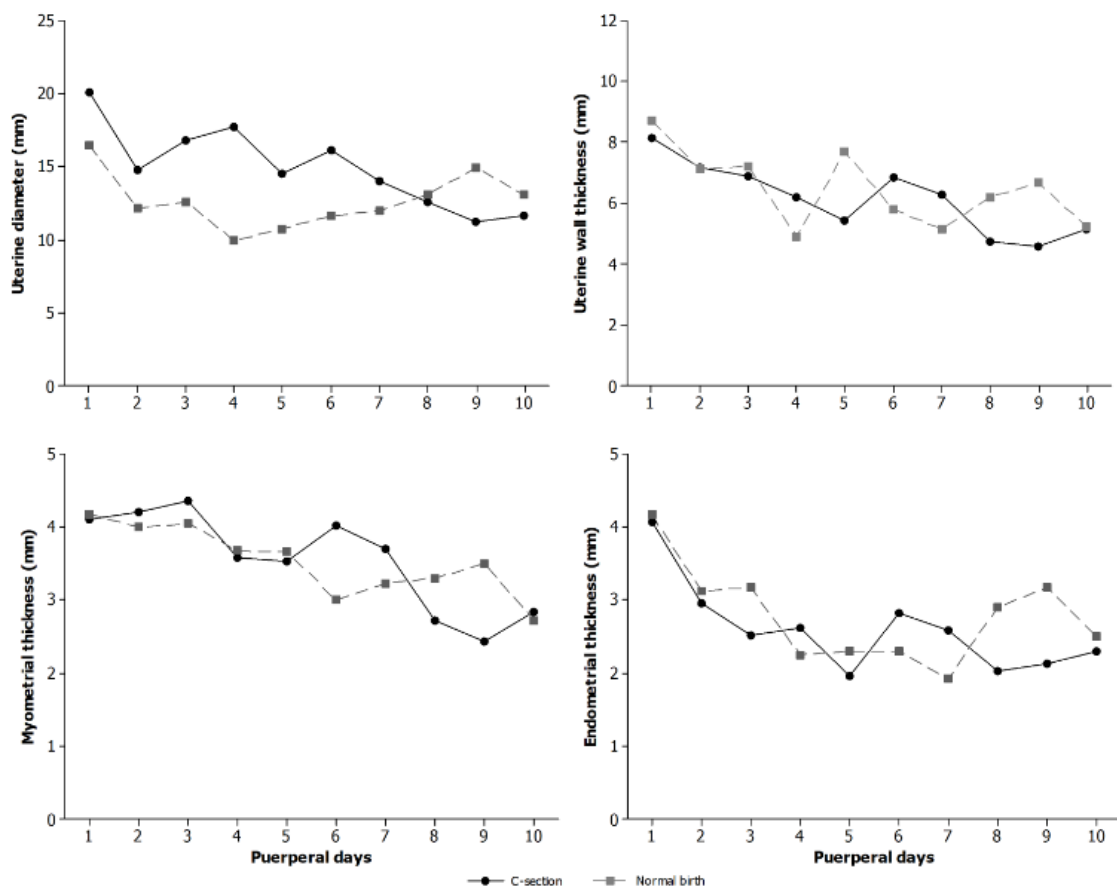


FIGURE 4 Graphical representation of the uterine diameter, uterine wall thickness, myometrial thickness and endometrial thickness, during the physiological post-partum period in normal delivery or c-section 12 brachycephalic bitches

TABLE 1 Mean $\pm$ SD of uterine biometry (uterine diameter, myometrial thickness, endometrial thickness and uterine wall thickness) measured during the physiological post-partum period in normal delivery or c-section 12 brachycephalic bitches

Post-partum days	Type of delivery	Uterine diameter (mm)	Myometrial thickness (mm)	Endometrial thickness (mm)	Uterine wall thickness (mm)
1	normal	16.50 $\pm$ 3.67Aa	4.17 $\pm$ 0.97Aa	4.16 $\pm$ 1.54Aa	8.73 $\pm$ 0.70Aa
1	c-section	20.10 $\pm$ 3.62Ba	4.10 $\pm$ 0.90Aa	4.06 $\pm$ 1.07Aa	8.16 $\pm$ 1.60Aa
2	normal	12.70 $\pm$ 1.27Ab	3.90 $\pm$ 0.61Aab	3.25 $\pm$ 0.96Ab	7.18 $\pm$ 0.80Ab
2	c-section	14.91 $\pm$ 2.96Bb	4.30 $\pm$ 1.31Aa	2.91 $\pm$ 0.68Ab	7.21 $\pm$ 1.74Ab
3	normal	12.62 $\pm$ 3.07Ab	4.05 $\pm$ 2.05Aa	3.17 $\pm$ 2.58Ab	7.22 $\pm$ 4.59Ab
3	c-section	16.78 $\pm$ 4.09Bb	4.35 $\pm$ 0.57Aa	2.52 $\pm$ 1.05Ac	6.87 $\pm$ 1.09Ac
4	normal	9.92 $\pm$ 2.04Ac	2.65 $\pm$ 0.99Ab	2.25 $\pm$ 0.74Ac	4.90 $\pm$ 1.12Ac
4	c-section	17.76 $\pm$ 7.16Bb	3.58 $\pm$ 0.97Ab	2.62 $\pm$ 1.02Ac	6.21 $\pm$ 1.79Ac
5	normal	12.16 $\pm$ 4.88Abc	3.66 $\pm$ 0.90Ab	2.20 $\pm$ 1.83Ac	7.70 $\pm$ 2.16Abc
5	c-section	15.15 $\pm$ 4.29Bc	3.53 $\pm$ 1.10Ab	1.96 $\pm$ 0.40Ac	5.41 $\pm$ 1.48Ac
6	normal	11.62 $\pm$ 2.24Abc	3.00 $\pm$ 0.61Ac	2.30 $\pm$ 0.35Ac	5.80 $\pm$ 1.12Ac
6	c-section	16.15 $\pm$ 2.96Bbc	4.02 $\pm$ 0.80Ab	2.82 $\pm$ 0.53Ac	6.85 $\pm$ 0.63Abc
7	normal	12.02 $\pm$ 2.96Abc	3.22 $\pm$ 1.05Ac	1.92 $\pm$ 0.76Ac	5.15 $\pm$ 1.73Abc
7	c-section	14.04 $\pm$ 4.34Abc	3.70 $\pm$ 0.86Ac	2.58 $\pm$ 1.57Ac	6.28 $\pm$ 1.62Abc
8	normal	13.10 $\pm$ 1.47 Abc	3.30 $\pm$ 1.21Ac	2.90 $\pm$ 0.82Ac	6.20 $\pm$ 1.48Abc
8	c-section	12.55 $\pm$ 3.15Abc	2.71 $\pm$ 0.45Ad	2.03 $\pm$ 0.44Ac	4.75 $\pm$ 0.61Ac
9	normal	14.95 $\pm$ 2.37Abc	3.50 $\pm$ 0.27Ac	3.17 $\pm$ 0.92Ac	6.67 $\pm$ 1.17Abc
9	c-section	12.52 $\pm$ 4.41Abc	2.57 $\pm$ 0.48Ad	2.58 $\pm$ 1.41Ac	5.15 $\pm$ 1.82Abc
10	normal	13.05 $\pm$ 2.33Abc	2.72 $\pm$ 0.82Ad	2.5 $\pm$ 0.88Ac	5.22 $\pm$ 1.05Abc
10	c-section	11.62 $\pm$ 2.76Ac	2.84 $\pm$ 0.69Ad	2.3 $\pm$ 0.73Ac	5.14 $\pm$ 0.49Abc
p-value Post-partum days		.0120	.8540	.5570	.9560
p-value Type of delivery		.0127	.0050	.0030	.0001

Note: Different upper-case letters indicate significance between delivery types and different lower-case letters between post-partum days (Tukey $p < .05$).

The thickness of the myometrium, endometrium and uterine wall presented gradual and significant involution ($p < .05$), similar between both groups ($p > .05$). The myometrial thickness involuted from the 1st to the 9th day ($p = .005$), characterized by linear regression ($MMT = 4.463 - 0.1660 \times DPP$; $p < .0001$ and $R^2 = 21\%$); the endometrial thickness involuted from the 1st to the 6th day ($p = .003$), characterized by linear regression which allows to estimate the normal values ($EMT = 3.347 - 0.1257 \times DPP$; $p = .04$ and $R^2 = 10\%$); and

the uterine wall thickness involuted from the 1st to 7th days ($p < .0001$) characterized by linear regression ($UWT = 7.856 - 0.2923 \times DPP$; $p = .001$ and $R^2 = 22\%$) (Figure 4, Table 1).

At the VTTQ™ quantitative elastography, the SWV of myometrium and endometrium were similar between groups ($p > .05$), presented a gradual increase from 1st to 10th DPP ($p = .0411$ and $.0043$, respectively), characterized in the myometrium ($VTTQ^{\text{TM}}$ MM SWV = $1.68 + 0.1 \times DPP$; $p < .0021$ and $R^2 = 54\%$), and in the endometrium ($VTTQ^{\text{TM}}$ EM SWV = $1.32 + 0.07 \times DPP$; $p < .0005$ and $R^2 = 49\%$) by linear regressions which allows to estimate the normal values. At VTTIQ™ quantitative elastography, the myometrial and endometrial SWVs were similar between groups ($p = .7048$) and between puerperal days ($p > .05$). There was no correlation ($p = .385$ $R = 0.122$) between the SWVs measuring by VTTQ™ and VTTIQ™ techniques, and there was no variation ($p > .05$) between the regions measured (Figure 5, Table 2).

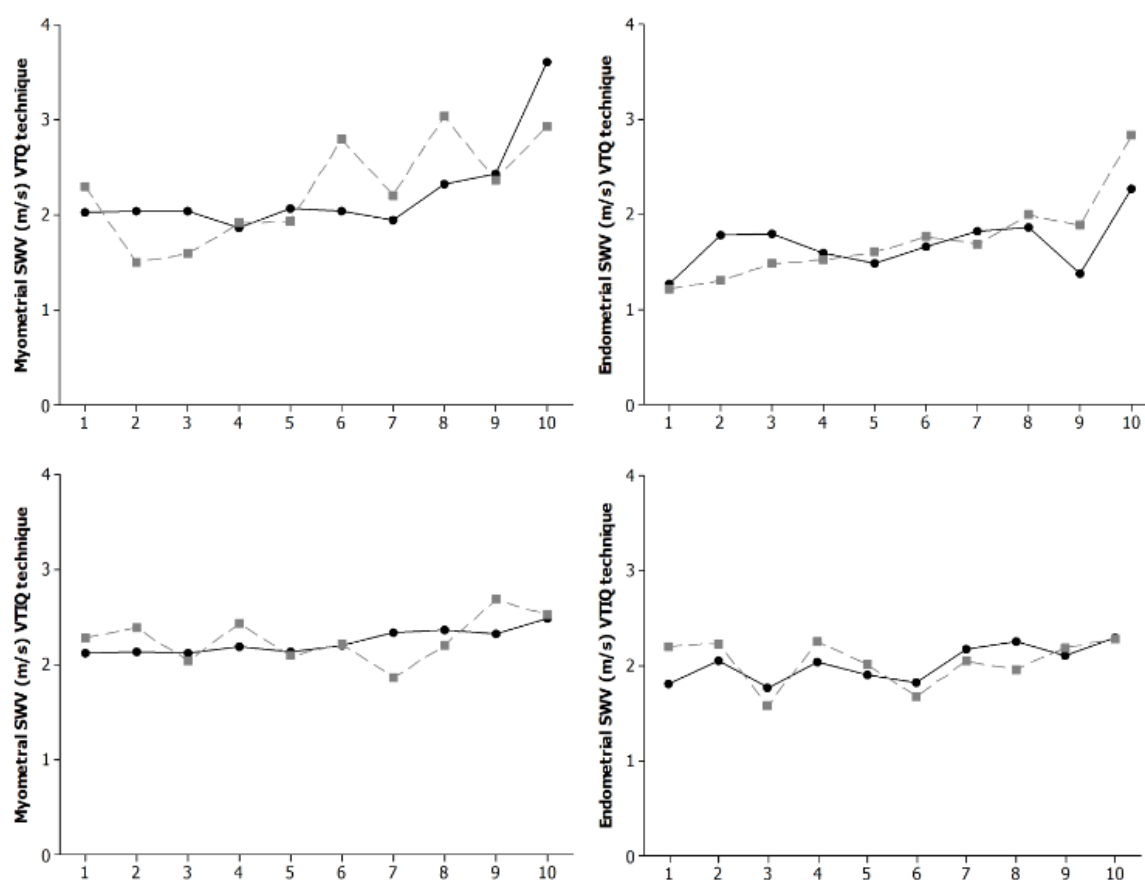


FIGURE 5 Graphical representation of myometrial and endometrial SWV (m/s) evaluated by VTTQ™ technique; myometrial and endometrial SWV (m/s) evaluated by VTTIQ™ technic, during the physiological post-partum period in normal delivery or c-section 12 brachycephalic bitches

TABLE 2 Mean $\pm$ SD of myometrial and endometrial stiffness evaluated by SWV (m/s) VTTQ™ technique; myometrial and endometrial SWV (m/s) evaluated by VTTIQ™ technique, during the physiological post-partum period in normal delivery or c-section 12 brachycephalic bitches

Post-partum days	Type of delivery	SWV (m/s) by VTTQ™		SWV (m/s) by VTTIQ™	
		Myometrial	Endometrial	Myometrial	Endometrial
1	normal	2.36 $\pm$ 0.73Aa	1.24 $\pm$ 0.30Aa	2.28 $\pm$ 0.15Aa	2.20 $\pm$ 0.14Aa
1	c-section	1.94 $\pm$ 0.97Aa	1.33 $\pm$ 0.68Aa	2.12 $\pm$ 0.68Aa	1.81 $\pm$ 0.46Aa
2	normal	1.27 $\pm$ 0.24Aa	1.29 $\pm$ 0.18Aa	2.75 $\pm$ 0.21Aa	2.64 $\pm$ 0.21Aa
2	c-section	1.86 $\pm$ 0.35Aa	1.53 $\pm$ 0.24Aa	2.05 $\pm$ 0.43Aa	1.99 $\pm$ 0.50Aa
3	normal	1.66 $\pm$ 0.68Aa	1.48 $\pm$ 0.34Aa	2.04 $\pm$ 0.35Aa	1.57 $\pm$ 0.11Aa
3	c-section	1.99 $\pm$ 0.57Aa	1.77 $\pm$ 0.83Ab	2.11 $\pm$ 0.28Aa	1.76 $\pm$ 0.36Aa
4	normal	1.92 $\pm$ 0.25Aa	1.52 $\pm$ 0.22Ab	2.43 $\pm$ 0.56Aa	2.25 $\pm$ 0.33Aa
4	c-section	1.89 $\pm$ 0.52Aa	1.57 $\pm$ 0.52Ab	2.18 $\pm$ 0.50Aa	2.04 $\pm$ 0.42Aa
5	normal	1.91 $\pm$ 0.81Aa	1.61 $\pm$ 0.44Ab	2.09 $\pm$ 0.15Aa	2.01 $\pm$ 0.19Aa
5	c-section	2.06 $\pm$ 0.80Aa	1.49 $\pm$ 0.28Ab	2.14 $\pm$ 0.34Aa	1.91 $\pm$ 0.34Aa
6	normal	2.68 $\pm$ 0.71Ab	1.76 $\pm$ 0.47Ab	2.22 $\pm$ 0.21Aa	1.68 $\pm$ 0.08Aa
6	c-section	1.88 $\pm$ 0.75Aa	1.66 $\pm$ 0.31Ab	2.20 $\pm$ 0.47Aa	1.82 $\pm$ 0.42Aa
7	normal	1.89 $\pm$ 0.73Aa	1.69 $\pm$ 0.39Ab	1.86 $\pm$ 0.30Aa	2.04 $\pm$ 0.44Aa
7	c-section	1.94 $\pm$ 0.31Aa	1.82 $\pm$ 0.51Ac	2.33 $\pm$ 0.34Aa	2.18 $\pm$ 0.30Aa
8	normal	3.03 $\pm$ 0.32Aab	1.99 $\pm$ 0.53Ac	2.20 $\pm$ 0.17Aa	1.96 $\pm$ 0.08Aa
8	c-section	2.25 $\pm$ 1.14Aab	1.86 $\pm$ 0.30Ac	2.36 $\pm$ 0.51Aa	2.52 $\pm$ 0.56Aa
9	normal	2.48 $\pm$ 0.39Ab	1.88 $\pm$ 0.21Ac	2.68 $\pm$ 2.36Aa	2.18 $\pm$ 0.32Aa
9	c-section	2.42 $\pm$ 0.49Ab	1.37 $\pm$ 0.29Ab	2.32 $\pm$ 0.45Aa	2.11 $\pm$ 0.31Aa
10	normal	2.93 $\pm$ 0.00Ab	2.83 $\pm$ 0.86Ac	2.52 $\pm$ 0.30Aa	2.28 $\pm$ 0.47Aa
10	c-section	3.37 $\pm$ 0.64Ac	2.30 $\pm$ 0.60Ac	2.48 $\pm$ 0.27Aa	2.29 $\pm$ 0.22Aa
p-value Post-partum days		.0411	.0043	.7519	.0891
p-value Type of delivery		.7846	.8273	.7048	.7149

Note: Different upper-case letters indicate significance between delivery types and different lower-case letters between post-partum days (Tukey $p < .05$).

4. DISCUSSION

Based on the results of the present study, the use of B-mode and ARFI ultrasonography to evaluate daily the puerperal uterus of brachycephalic bitches was feasible and applicable, causing no evident changes in maternal or neonatal health, as described in elastography previous studies in women (Tanaka et al., 2011) and biometric in bitches (Barbosa et al., 2013; Ferri & Vicente, 2002; Ferri et al., 2003).

The type of delivery influenced the uterine diameter (12.53 ± 2.64 mm in normal delivery and 15.26 ± 4.73 mm in c-section), being these values similar that reported by Barbosa et al. (2013) (1.11 ± 0.16 ; 1.24 ± 0.31 cm, respectively), highlighting the involution during the first post-partum week. The differences in uterine involution after normal delivery and c-section denoted that physiological delivery had higher recovery rate, probably due to the more effective action of $\text{PGF2}\alpha$, which has a vasodilation function and stimulates oxytocin that produce uterine contractions (Barbosa et al., 2013; Hoffmann, Riesenbech, & Klein, 1996). It could also be related to the hypothesis that surgery has a negative influence on the uterine regression as proposed by Ferri et al. (2003) during the first week post-partum. According to Mijten, Kruif, Weyden, and Deluyker (1997), inadequate manipulation and trauma during surgery can lead to complications such as haemorrhage and ischaemia that compromise uterine tissue recovery. In contrast, only one study Voorwald and Tiosso (2015) defends the assumption that the surgical manipulation has no effect on puerperal recuperation.

Another physiological explanation for uterine involution be faster in normal delivery is a placental detachment, that occurs simultaneously with strong contractions in the latent phase inducing shear forces between the uterine wall and the placenta, causing its separation (Herman et al., 2002), while in c-section, the placenta is removed by gentle manual traction between foetal placenta (trophoblast) and uterine placenta, minimizing bleeding (Onclin & Verstegen, 2008).

The breastfeeding has a positive influence on female uterine involution, due to increases in uterine contractions during the immediate post-partum (Chua, Arulkumaran, Lim, Selamat, & Ratnam, 1994) by oxytocin release in response to

mammary stimulation and auditory stimuli of newborn vocalization (Uvnas-Moberg & Eriksson, 1996) that are earlier in animals that cub physiologically. Myometrial contractions promote decrease in uterine volume, particularly in lumen and uterine wall thickness as evidenced in this study and previously by Grunert and Birgel (1989). Chronologically Yeager and Concannon (1990) described that throughout the puerperium, the size of the organ changes and decreases progressively, between one to four days, the musculature declines the ability to react to contraction when the involution reach of 60% of its original volume (Landim-Alvarenga, 2006) and concomitant to involution start the regenerative changes in glandular and epithelial structures (Chu, Salamonsen, Lee, & Wright, 2002; Orfanou et al., 2009).

Myometrial and endometrial layers in own study showed significant and gradual involution, corroborating Yeo et al. (2007) who found a rapid decrease in myometrial and endometrial thickness in miniature Schnauzer bitches during 7 days after eutocia delivery. However, no comparisons between the involution of the uterine layers after c-section were found in the literature, nor with respect to the thickness of the uterine wall. The uterine lumen was evidenced during the study with normal locus expulsion and without any evidence of pathological processes, observations consistent with those described by Barbosa et al. (2013).

All these modifications described accompanied the sonographic myometrial and endometrial characteristics verified during the first 10 days after parturition in this study, and corroborate the histological descriptions previous reported by Al-Bassam, Thomson, and O'donnell (1981); the myometrium is thick and with intertwined bundles of collagen fibres between muscle bundles of the

longitudinal and external circular muscle layers; and the endometrium is composed of primary folds formed by the swollen lamina propria and secondary folds related to rough coating, with proliferation of collagen fibres and slight infiltration of mononuclear cells of the endometrial lamina. These characteristics give the myometrium a stronger tissue characteristic, which is evident by its higher SWV-rated stiffness, as well as a greater thickness.

To date, no found reports using the ARFI elastography to assess changes in uterine stiffness during post-partum in animals. Tanaka et al. (2011) were the first researchers to quantify the changes in uterine stiffness in women after normal childbirth, using the VTTQ™ technique, before delivery, immediately, 1 and 2 hr after placental expulsion and related that uterine body rigidity increased over this time, similarly to our results in myometrial and endometrial stiffness evaluation by VTTQ™ method, even with close values of SWV. Regardless of the delivery type, the stiffness of the uterine wall gradually increases; this behaviour can be explained by the histology changes that occur in the process of uterine involution, in which the smooth muscles of the myometrium decrease in length, with thickening of the wall, formation of folds in the mucosa; and the endometrium suffers a decrease in surface, with formation of folds and production of locus (LandimAlvarenga, 2006).

Although there was no correlation between VTTQ™ and VTTIQ™ techniques, it is considered that any of them can be used to assess post-partum uterine wall integrity. This is the first study that evaluates changes in uterine elasticity during puerperium in dogs, defining normal patterns for the species, with the hypothesis that pathological conditions alter tissue stiffness and thickness during post-partum period and these diagnostic tools could become early

indicators of uterine disease in canines. Another important concept is post c-section uterine involution dynamics characterization, once this type of delivery is more susceptible to uterine complications (Ferri et al., 2003), and its early recognition can improve and preserving the health and life of breeding bitches.

5. CONCLUSION

Canine uterine biometric and elastography evaluation was feasible and the results reveal that female dogs with eutocia delivery had more rapid puerperal involution than animals submitted to c-section. Post-partum uterine stiffness gradually increased with uterine involution, was similar for bitches with normal delivery and c-section. This suggests that the recorded standards are significant and provide important unpublished information, validating the techniques and providing reference values for uterine post-partum evaluation. It is intended that this information has a positive effect in the obstetrics veterinary practice and to favour future investigation involving the health of the puerperium in the most diverse species.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the research grant and productivity scholarship award (processes 140189/2017-3 and 309199/2017-4, respectively), and the State of Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) for the thematic project scholarship (process 2017/14957-6) and EMU program (Process 2019/09197-8). The authors also thank Jair Matos and Siemens Healthineers for technical assistance.

REFERENCES

- Al-Bassam, M. A., Thomson, R. G., & O'Donnell, L. (1981). Normal postpartum involution of the uterus in the dog. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 45, 217-232.
- Barbosa, C. C., Souza, M. B., Freitas, L. A., Silva, T. F. P., Domingues, S. F. S., & Silva, L. D. M. (2013). Assessment of uterine involution in bitches using B-mode and Doppler ultrasonography. *Animal Reproduction Science*, 139, 121-126. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.027>
- Beccaglia, M., Alonge, S., Trovo', C., & Luvoni, G. C. (2016). Determination of gestational time and prediction of parturition in dogs and cats: An update. *Reproduction in Domestic Animals*, 51, 12-17. <https://doi.org/10.1111/rda.12782>
- Che, D., Wei, H., Yang, Z., Zhang, Y., Ma, S., & Zhou, X. (2019). Application of transvaginal sonographic elastography to distinguish endometrial cancer from benign masses. *American Journal of Translational Research*, 11, 1049-1057.
- Chu, P. Y., Salamonsen, L. A., Lee, C. S., & Wright, P. J. (2002). Matrix metalloproteinases (MMPs) in the endometrium of bitches. *Reproduction*, 123, 467-477. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230467>
- Chua, S., Arulkumaran, S., Lim, I., Selamat, N., & Ratnam, S. S. (1994). Influence of breastfeeding and nipple stimulation on postpartum uterine activity. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 101, 804-805. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1994.tb11950.x>

- Davidson, A. P., & Baker, T. W. (2009). Reproductive ultrasound of the bitch and queen. *Topics in Companion Animal Medicine*, 24, 55-63.
<https://doi.org/10.1053/j.tcam.2008.11.002>
- Domanska, D., Domino, M., Trela, M., Ciszewska, B., Borzyszkowski, K., Gizinski, S., ... Gajewski, Z. (2018). *Application of real- time ultrasound elastography the mare's uterus*, 53, 7.
- England, G. C. W., & Russo, M. (2006). Ultrasonographic characteristics of early pregnancy failure in bitches. *Theriogenology*, 66, 1694-1698.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.028>
- Feldman, E. C., & Nelson, R. W. (1986). *Canine and feline endocrinology and reproduction*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders.
- Feliciano, M. A. R., Garcia, P. H. S., & Vicente, W. R. R. (2015). Introdução à Ultrassonografia. In M. A. R. Feliciano, J. C. Canola, & W. R. R. Vicente (Eds.), *Diagnóstico por imagem em cães e gatos* (pp. 54-77). São Paulo, Brazil: MedVet.
- Ferri, S. T. S., & Vicente, W. R. R. (2002). Estudo ultra-sonográfico da involução uterina pós-parto em cadelas. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia*, 54, 19-23. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352002000100003>
- Ferri, S. T. S., Vicente, W. R. R., & Toniollo, G. H. (2003). Ultrasonographic study of the postpartum uterine involution in bitches after cesarean section. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia*, 55, 167-172.
- Fossum, T. W. (2015). Cirurgias dos sistemas reprodutivo e genital. *Cirurgia de pequenos animais* (pp. 780-809). Rio de Janeiro, Brazil: Elsevier.

- Fuchs, T., Pomorski, M., & Zimmer, M. (2013). Quantitative cervical elastography in pregnancy. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 41, 712. <https://doi.org/10.1002/uog.12474>
- Gil, E. M. U., Garcia, D. A. A., Giannico, A. T., & Froes, T. R. (2014). Canine fetal heart rate: Do accelerations or decelerations predict the parturition day in bitches? *Theriogenology*, 82, 933-941. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.025>
- Grunert, E., & Birgel, E. H. (1989). *Obstetrícia veterinária* (pp. 129-135). Porto Alegre, Brazil: Sulina.
- Herman, H., Zimerman, A., Arieli, S., Tovbin, Y., Bezer, M., Bukovsky, I., & Panski, M. (2002). Down–up sequential separation of the placenta. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 19, 278-281. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0705.2002.00557.x>
- Hirt, R. A., Kneissl, S., & Teinfalt, M. (2000). Severe hypercalcemia in a dog with a retained fetus and endometritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 216, 1423–1425. <https://doi.org/10.2460/javma.2000.216.1423>
- Hoffmann, B., Riesenbeck, A., & Klein, R. (1996). Reproductive endocrinology of bitches. *Animal Reproduction Science*, 42, 257-288. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01484-4](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01484-4)
- Johnston, S. D. (1986). Parturition and dystocia in the bitch. In D. A. Morrow (Ed.), *Current therapy in theriogenology 2: Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals* (pp. 500-501). Philadelphia, PA: Saunders.

- Karaman, E., Arslan, H., Çetin, O., Şahin, H. G., Bora, A., Yavuz, A., ... Akbudak, I. (2016). Comparison of placental elasticity in normal and preeclamptic pregnant women by acoustic radiation force impulse elastosonography. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 42, 1464-1470.
- Landim-Alvarenga, F. C. L. (2006). Parto Normal. In C. P. Nereu, & F. C. L. Landim-Alvarenga (Eds). *Obstetrícia Veterinária* (pp. 82-96). Rio de Janeiro, Brazil: Guanabara.
- Lu, J., Cheng, Y. K. Y., Ho, S. Y. S., Sahota, D. S., Hui, L. L., Poon, L. C., & Leung, T. Y. (2019). The predictive value of cervical shear wave elastography in the outcome of labor induction. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, 00, 1-10.
- Luvoni, G. C., & Grioni, A. (2000). Determination of gestational age in medium and small size bitches using ultrasonographic fetal measurements. *Journal of Small Animal Practice*, 41, 292-294. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2000.tb03204.x>
- Magata, F., Hartmann, D., Ishii, M., Miura, R., Takahashi, H., Matsui, M., ... Bollwein, H. (2013). Effects of exogenous oxytocin on uterine blood flow in puerperal dairy cows: The impact of days after parturition and retained fetal membranes. *The Veterinary Journal*, 196, 76-80. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.08.010>
- Manchanda, S., Vora, Z., Sharma, R., Hari, S., Das, C. J., Kumar, S., ... Khan, M. A. (2019). Quantitative sonoelastographic assessment of the normal uterus using shear wave elastography: an initial experience. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 00, 1-7. <https://doi.org/10.1002/jum.15019>

- Maronezi, M. C., Feliciano, M. A. R., & Vicente, W. R. R. (2019). Elastografia e ultrassonografia contrastada. In M. A. R. Feliciano, A. R. Assis, & W. R. R. Vicente (Eds.), *Ultrassonografia em cães e gatos* (pp. 33-35). São Paulo, Brazil: Medvet.
- Mijten, P., Kruif, A., Van der Weyden, G. C., & Deluyker, H. (1997). Comparison of catgut and polyglactin 910 for uterine sutures during bovine caesarean sections. *Veterinary Record*, 140, 458-459. <https://doi.org/10.1136/vr.140.17.458>
- Muscatello, A., Di Nicola, M., Accurti, V., Mastrocola, N., Franchi, V., Colagrande, I., ... Carta, G. (2014). Sonoelastography as method for preliminary evaluation of uterine cervix to predict success of induction of labor. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 35, 57-61. <https://doi.org/10.1159/000355084>
- Onclin, K. J., & Verstegen III, J. P. (2008). *Cesarean section in the dog*. NAVC Clinician's Brief, 72-78.
- Orfanou, D. C., Ververidis, H. N., Pourlis, A., Fragkou, I. A., Kokoli, N. A., Boscós, C. M., ... Fthenakis, G. C. (2009). Post-partum involution of the canine uterus- gross anatomical and histological features. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 152-155. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01388.x>
- Pharr, J. W., & Post, K. (1992). Ultrasonography and radiography of the canine postpartum uterus. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 33, 3540. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.1992.tb01954.x>
- Pretzer, S. D. (2008). Medical management of canine and feline dystocia. *Theriogenology*, 70, 332-336. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.031>

- Silva, L. C. G. (2008). *Parâmetros clínicos, hemogasométricos e radiográficos para avaliação respiratória de neonatos caninos nascidos em eutocia ou cesariana eletiva*. Dissertação (mestrado) (pp 75f.). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
- Stoelinga, B., Hehenkamp, W. J., Brolmann, H. A., & Huirne, J. A. (2014). Real-time elastography for assessment of uterine disorders. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 43, 218-226. <https://doi.org/10.1002/uog.12519>
- Tanaka, T., Makino, S., Saito, T., Yorifuji, T., Koshiishi, T., Tanaka, S., ... Takeda, S. (2011). Attempt to quantify uterine involution using acoustic radiation force impulse before and after placental delivery. *Journal of Medical Ultrasonics*, 38, 21-25. <https://doi.org/10.1007/s10396-010-0292-5>
- Thomas, A. (2006). Imaging of the cervix using sonoelastography. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 28, 356-357. <https://doi.org/10.1002/uog.3813>
- Uvnas-Moberg, K., & Eriksson, M. (1996). Breastfeeding: Physiological, endocrine and behavioural adaptations caused by oxytocin and local neurogenic activity in the nipple and mammary gland. *Acta Paediatrica*, 85, 525-530. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1996.tb14078.x>
- Voorwald, F. A., & Tiosso, C. F. (2015). Puerpério. In M. Apparício, & W. R. R. Vicente (Eds.). *Reprodução e Obstetrícia em Cães e Gatos* (pp. 219-225). São Paulo, Brazil: MedVet.
- Yamaguchi, S., Kamei, Y., Kozuma, S., & Taketani, Y. (2007). Tissue elastography imaging of the uterine cervix during pregnancy. *Journal of Medical Ultrasonics*, 34, 209-210. <https://doi.org/10.1007/s10396-007-0150-2>

- Yeager, A. E., & Concannon, P. W. (1990). Serial ultrasonographic appearance of postpartum uterine involution in beagle dogs. *Theriogenology*, 38, 523-535. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(90\)90009-I](https://doi.org/10.1016/0093-691X(90)90009-I)
- Yeo, W. C., Kim, B. S., Yun, C. J., Park, C. H., Kim, J. B., Moon, J. S., ... Son, C. H. (2007). Serial ultrasonographic evaluation of postpartum Quantitative sonoelastographic assessment of the uterine involution in miniature schnauzer dogs. *Journal of Embryo Transfer*, 22, 229-234.
- Yilmaz, O., & Uçar, M. (2012). Ultrasonography of postpartum uterine involution in a bitch. *Kocatepe Veterinary Journal*, 5, 55-58.
- Zhang, M., Wasnik, A. P., Masch, W. R., Rubin, J. M., Carlos, R. C., Quint, E. H., & Maturen, K. E. (2019). Transvaginal ultrasound shear wave elastography for the evaluation of benign uterine pathologies: A prospective pilot study. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 38, 149-155. <https://doi.org/10.1002/jum.14676>