

# Pablo R. Batista

## Tesis Doctoral

APLICABILIDAD DE LA ULTRASONOGRAFÍA DOPPLER Y  
ELECTROCARDIOGRAFÍA EN LA EVALUACIÓN DE PARÁMETROS  
CARDIOVASCULARES EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS  
UTERINAS DE LOS CANINOS DOMÉSTICOS



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA





**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de  
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**APLICABILIDAD DE LA ULTRASONOGRAFÍA DOPPLER Y  
ELECTROCARDIOGRAFÍA EN LA EVALUACIÓN DE PARÁMETROS  
CARDIOVASCULARES EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y  
PATOLÓGICAS UTERINAS DE LOS CANINOS DOMÉSTICOS**

**AUTOR:** BATISTA, Pablo Rodrigo

**DIRECTOR:** BLANCO, Paula Graciela

**DIRECTOR:** GOBELLO, Cristina

**CODIRECTOR:** CORRADA, Yanina Alejandra

**LUGAR DE TRABAJO:** Servicio de Cardiología, Hospital Escuela, Facultad de  
Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

**MIEMBROS DEL JURADO:**

DE PALMA, Viviana

FERNANDEZ, Patricia

GONZALEZ, Griselda

**AÑO 2016**

*A mi familia...*

*A mis amigos...*

*A mis mascotas...*

“Tú serás para mí único en el mundo, yo seré para ti único en el mundo [...] Los hombres han olvidado esta verdad -dijo el zorro-, pero tú no debes olvidarla. Eres responsable para siempre de lo que has domesticado”.

*Antoine de Saint-Exupéry*

*“El Principito”*

## AGRADECIMIENTOS

Es muy gratificante mirar hacia atrás y ver que este largo camino transitado fue en compañía de gente maravillosa que hizo que todo esto fuera posible. Haber llegado hasta acá es un logro que también les pertenece. A todos ellos, gracias...

A mis directoras, las Doctoras Paula Blanco y Cristina Gobello, por su ayuda incondicional, por abrirme las puertas al mundo de la ciencia, y transmitirme la pasión por la búsqueda del conocimiento. Por enseñarme que con compromiso, dedicación y disciplina se pueden alcanzar metas maravillosas. A mi codirectora, la Dra. Yanina Corrada por su ayuda y apoyo para poder desarrollar este proyecto.

Al Dr. Daniel Arias, porque con los brazos abiertos me dio la bienvenida al Servicio de Cardiología, brindándome todo el apoyo e introduciéndome a un maravilloso grupo de gente. Con afecto y sabiduría me transmitió la pasión por el trabajo en equipo. Equipo que desde su lugar sueña con construir un mundo mejor.

A mi familia. A mis padres, Isabel y Oscar, por inculcarme la importancia del estudio y el trabajo. Por darme las herramientas que me ayudan a transitar la vida tratando de hacer el bien. Por enseñarme el amor y el respeto por los animales. Gracias a mi mamá por el hermoso óleo que ilustra la portada de esta tesis. A mis hermanos Daniel, Paula y Laura. A mis abuelos, Trinidad y Vicente. A mis tíos, primos y sobrinos. Gracias por acompañarme siempre, gracias por su amor.

A mis amigos. A Jennifer, Lorena, Romina, Daniela, Marcela, Carolina, Melina, Laura P. A Bernardo. A Laura B. Gracias por estar, por ser mi cable a tierra, por acompañarme. Gracias por su incondicionalidad y cariño. A todos los amigos entrañables que esta hermosa carrera y profesión me fueron dando a lo largo de los años.

A Métodos Complementarios de Diagnóstico, en especial a sus profesores Mariana Tórtora, Adriana Aprea, Raúl Rodríguez y Eduardo Pons por confiar en mí, brindarme el espacio, los medios y todo el apoyo para llevar adelante este proyecto.

A los Servicios de Cardiología y Ultrasonografía, a mis compañeros de trabajo y estudio. Gracias por las horas compartidas, por su apoyo incondicional y su amistad. Gracias a Silvita, Nico, Titi, Andrés, Damián, Analía, Marianela, Lorena, Paola, Lau, Anita. Un especial agradecimiento a la Dra. Ana Rube, por su compromiso y afecto, indispensables para alcanzar esta meta.

Al Laboratorio de Fisiología Reproductiva. A Mariana, Anita y Lucía, por toda la ayuda y el apoyo brindado a lo largo de estos años.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias y a la Universidad Nacional de La Plata, por brindarme una educación de excelencia, por ser un lugar al que siempre quiero llegar, por ser un hogar para mí.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por el financiamiento de la beca que me permitió llevar a cabo este trabajo de Tesis.

A mi tierra, mi país, mi querida Argentina que me brindó la posibilidad de acceder a una formación de excelencia gracias a su educación pública y gratuita y hoy me da la posibilidad de dedicarme a lo que me apasiona en pos de una sociedad de la que orgullosamente formo parte.

A los jurados, por sus contribuciones para el desarrollo de este trabajo.

A los propietarios de las mascotas que formaron parte de este proyecto. A los Criaderos Gos Bon Gos y von Axmann.

A todas las mascotas que me acompañaron a lo largo de mi vida, brindándome la forma más pura de amor. A Lucy. A todas las perritas que participaron de este proyecto.

A Dios, por poner a todas estas maravillosas personas en mi camino y hacer que todo fuera posible.

## **PUBLICACIONES PARCIALES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS**

### **Publicaciones en revistas científicas internacionales**

Batista PR, Gobello C, Corrada Y, Pons E, Arias DO, Blanco PG. Doppler ultrasonographic assessment of uterine arteries during normal canine puerperium. *Anim Reprod Sci.* 2013; 141: 172-176.

Batista PR, Gobello C, Rube A, Corrada YA, Tórtora M, Blanco PG. Uterine blood flow evaluation in bitches suffering from cystic endometrial hyperplasia (CEH) and CEH-pyometra complex. *Theriogenology.* 2016; 85: 1258-1261.

### **Publicaciones en revistas científicas nacionales**

Batista PR, Gobello C, Rodríguez RR, Tórtora M, Corrada YA, Arias DO, Blanco PG. Flujo sanguíneo uterino durante el puerperio canino normal. *Analecta Veterinaria*, 2016 (En Prensa). ***Artículo ganador del premio “Tesis en curso”- Edición 2015, otorgado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP).***

### **Publicaciones en eventos científicos de alcance internacional**

Batista PR, Blanco PG, Tórtora M, Arias DO, Corrada YA, Gobello C. Doppler ultrasonographic assessment of uterine arteries during normal canine puerperium. 7° International Symposium of Canine and Feline Reproduction. Organizado por el European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR) del 26 al 29 de Julio de 2012. Whistler, Canadá.

Batista PR, Gobello C, Corrada YA, Arias DO, Tórtora M, Blanco PG. Echocardiographic assessment of cardiac dimensions and systolic function during canine puerperium. ACVIM Forum 2013. Organizado por el American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) del 12 al 15 de Junio de 2013. Seattle, Estados Unidos.

Batista PR, Gobello C, Corrada YA, Rube A, Re N, Arias DO, Blanco PG. Evaluación ecocardiográfica y Doppler de la función cardiovascular durante el puerperio canino normal. 8vas Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. Organizadas por el Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires el 9 y 10 de Agosto de 2013. Mar del Plata, Argentina.

Batista PR, Gobello C, Arias DO, Tórtora M, Rodríguez RR, Corrada YA, Blanco PG. Doppler ultrasonographic assessment of uterine arteries in bitches suffering from cystic endometrial hyperplasia (CEH) and CEH-pyometra complex. II Simposio Latinoamericano de

Reproducción Animal. Organizado por la Universidad de Chile el 13 y 14 de Noviembre de 2014. Santiago de Chile, Chile.

Batista PR, Gobello C, Arias DO, López Merlo M, Barrena JP, Corrada YA, Blanco PG. Evaluación y rango de referencia ultrasonográfico Doppler de las arterias uterinas durante la gestación en hembras caninas de razas pequeñas. I Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Reproducción Animal. Organizado por la Sociedad Latinoamericana de Reproducción Animal del 25 al 28 de Marzo de 2015. Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Batista PR, Gobello C, Tórtora M, Barrena JP, Corrada YA, Arias DO, Blanco PG. Electrocardiographic changes during normal canine puerperium. ECVIM-CA Congress 2015. Organizado por el European College of Veterinary Internal Medicine del 10 al 12 de Septiembre de 2015. Lisboa, Portugal.

Batista PR, Gobello C, Rube A, Vercellini R, Olgún S, Blanco M, Rodríguez R y Blanco P. Evaluación del flujo sanguíneo uterino en hembras caninas con hiperplasia endometrial quística (HEQ) y complejo HEQ-Piómetra. 5° Jornadas Internacionales de AADIVE. Organizado por la Asociación Argentina de Diagnóstico por Imágenes en Veterinaria (AADIVE) el 5 y 6 de Octubre de 2015. Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Batista PR, Gobello C, Rube A, Vercellini R, Tórtora M, Rodríguez RR, Arias DO, Blanco PG. Reference range of the gestational uterine artery resistance index in toy canine breeds. 8° International Symposium of Canine and Feline Reproduction. Organizado por el European



Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR) del 22 al 24 de Junio de 2016.  
París, Francia (Aceptado).

### **Publicaciones en eventos científicos de alcance nacional**

Batista PR, Arias DO, Corrada YA, Prio V, Barrena JP, Gobello C, Blanco PG. Evaluación ultrasonográfica Doppler de las arterias uterinas durante el puerperio normal canino. XII Congreso Nacional de AVEACA. Organizado por la Asociación de veterinarios especializados en animales de compañía de Argentina (AVEACA) el 23 y 24 de Agosto de 2012. Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Batista PR, Gobello C, Corrada YA, Tórtora M, Rube A, Pons E, Rodríguez RR, Arias DO, Blanco PG. Aplicabilidad de la ultrasonografía Doppler y electrocardiografía en la evaluación de parámetros cardiovasculares en condiciones fisiológicas y patológicas uterinas de los caninos domésticos. Jornadas de Ciencia y Técnica 2014. Organizado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata el 28 de Noviembre de 2014. La Plata, Argentina.

Batista PR, Gobello C, Tórtora M, Barrena JP, Arizmendi A, Rodríguez RR, Arias DO, Blanco PG. Cambios electrocardiográficos durante el puerperio canino normal. XV Congreso Nacional de AVEACA. Organizado por la Asociación de veterinarios especializados en

animales de compañía de Argentina (AVEACA) el 24 y 25 de Septiembre de 2015. Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
SUMMARY.....	4
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	6
CAPÍTULO I: Rango de referencia del índice de resistencia de la arteria uterina durante la gestación en hembras caninas de razas pequeñas .....	16
CAPÍTULO II: Evaluación ultrasonográfica Doppler de las arterias uterinas durante el puerperio canino normal.....	27
CAPÍTULO III: Evaluación ecocardiográfica y electrocardiográfica durante el puerperio canino normal .....	41
CAPÍTULO IV: Evaluación del flujo sanguíneo uterino en hembras caninas con hiperplasia endometrial quística (HEQ) y complejo HEQ-piómetra.....	63
CONCLUSIONES FINALES.....	75
ANEXOS.....	77

## ABREVIATURAS

**ANOVA:** Análisis de varianza

**Circ/s:** Circunferencias por segundo

**Dinas/s:** Dinamos por segundo

**GB:** Conteo de glóbulos blancos

**kg:** Kilogramos

**L/m:** Litros por minuto

**lpm:** Latidos por minuto

**m/s:** Metros por segundo

**MHz:** Megahertz

**mL:** Mililitros

**mm:** Milímetros

**mm Hg:** Milímetros de mercurio

**ms:** Milisegundos

**mV:** Milivoltios

**APLICABILIDAD DE LA ULTRASONOGRAFÍA DOPPLER Y  
ELECTROCARDIOGRAFÍA EN LA EVALUACIÓN DE PARÁMETROS  
CARDIOVASCULARES EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS  
UTERINAS DE LOS CANINOS DOMÉSTICOS**

**Palabras clave:** Ultrasonografía Doppler; Ecocardiografía; Electrocardiografía; Útero; Caninos

**Resumen**

Los objetivos del presente trabajo de tesis fueron: establecer los rangos de referencia del índice de resistencia de la arteria uterina en la gestación canina normal de hembras de razas pequeñas; evaluar las arterias uterinas durante el puerperio canino por medio de ultrasonografía Doppler; analizar la estructura, función sistólica y electrofisiología cardíacas durante este período y determinar los cambios en la estructura y el flujo sanguíneo del útero en distintas enfermedades uterinas caninas. De un total de 162 perras, 52 fueron hembras gestantes de razas pequeñas, 20 se encontraban en puerperio y 90 en diestro. Estas últimas fueron clasificadas en distintos grupos según presentaran piómetra, hiperplasia endometrial quística con y sin contenidos luminales o diestro normal. Las hembras gestantes presentaron una disminución progresiva del IR de la arteria uterina. Adicionalmente, los rangos de referencia para el IR en estas razas fueron de 0,60 a 0,84 para el día 30, de 0,53 a 0,79 para el día 40, de 0,48 a 0,76 para el día 50 y de 0,49 a 0,69 para el día 60. Las perras en puerperio fueron evaluadas durante 80 días postparto, mediante ultrasonografía bidimensional y Doppler, ecocardiografía y electrocardiografía. Durante este período se observó una regresión de las estructuras uterinas y un incremento progresivo del IR de la arteria uterina. Asimismo, la contractilidad y función

sistólica cardíacas disminuyeron y se produjo la regresión de algunos cambios estructurales gestacionales. La frecuencia cardíaca e intervalo QT corregido disminuyeron, mientras que se incrementó la amplitud de la onda P y del complejo QRS. Finalmente, en las hembras en diestro el flujo sanguíneo uterino en perras con piómetra fue más alto que en las perras normales y con hiperplasia endometrial quística. Además, las hembras con hiperplasia endometrial quística con y sin colecta tuvieron un flujo sanguíneo uterino más alto que las normales. Se concluye que los parámetros cardíacos y vasculares son modificados por diversas condiciones fisiológicas y patológicas uterinas de los caninos. El monitoreo de dichas modificaciones podría tener aplicación diagnóstica y pronóstica en esta especie.

**APPLICABILITY OF DOPPLER ULTRASOUND AND ELECTROCARDIOGRAPHY  
IN THE ASSESSMENT OF CARDIOVASCULAR PARAMETERS IN  
PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL CANINE UTERINE CONDITIONS**

**Key words:** Doppler ultrasound, Echocardiography, Electrocardiography, Uterus, Dogs

**Summary**

Using Doppler ultrasound, the objectives of this Thesis were: to establish the reference range of the uterine artery resistance index during normal gestation in canine toy breeds; to evaluate the uterine arteries during normal canine puerperium and to determine and compare uterine blood flow in different canine uterine diseases. Finally, the echocardiographic and electrocardiographic changes during normal canine puerperium were also evaluated. Fifty-two pregnant (toy breeds), 20 puerperal and 90 diestrous bitches were included. These 90 bitches were classified according to the diagnosis of pyometra, cystic endometrial hyperplasia either with or without uterine contents or normal diestrus. The pregnant toy bitches showed a progressive diminution of the uterine arteries RI. In addition, RI reference range were 0.60 to 0.84, 0.53 to 0.79, 0.48 to 0.76 and 0.49 to 0.69 for days 30, 40, 50 and 60, respectively. The puerperal bitches were evaluated using bidimensional and Doppler ultrasound, echocardiography and electrocardiography. A regression of the uterine structures and a progressive increase of the uterine arteries RI were observed. Cardiac contractility and systolic function diminished, while some structural changes regressed. Maternal heart rate and corrected QT interval diminished, while P wave and QRS amplitudes increased. Finally, the

bitches suffering from pyometra had a higher uterine blood flow than bitches with cystic endometrial hyperplasia and bitches in normal diestrus. In addition, the bitches with and without uterine contents had a higher uterine blood flow than normal bitches. It is concluded that cardiac and vascular parameters are modified by different physiological and pathological uterine conditions in dogs. The evaluation of these changes may have diagnostic and prognostic value in this species.



## INTRODUCCIÓN GENERAL

En los últimos años el crecimiento de la población canina ha ido acompañado de un mayor interés en el estudio de la reproducción de esta especie. El conocimiento de los procesos fisiopatológicos involucrados garantiza un adecuado diagnóstico temprano de posibles alteraciones, permitiendo alcanzar una mayor eficiencia reproductiva. Con el fin de lograr este propósito, en las últimas décadas se ha visto un crecimiento exponencial de la aplicación de diversas herramientas diagnósticas. Entre ellas, la ultrasonografía ha adquirido una gran relevancia en el manejo reproductivo de carnívoros domésticos (England y col., 2003; Davidson y Baker, 2009). Esta técnica es utilizada rutinariamente en el diagnóstico y monitoreo de la gestación, pudiendo tanto estimar la fecha de parto como detectar complicaciones obstétricas (Yeager y col., 1992; England, 1998). Asimismo, la ultrasonografía es una de las principales herramientas para el diagnóstico no invasivo de enfermedades del tracto reproductivo, como el complejo hiperplasia endometrial quística – piómetra (Bigliardi y col., 2004; Davidson y Baker, 2009). Esta técnica diagnóstica se ha utilizado a su vez para estudiar los cambios que ocurren en la circulación periférica y el corazón en diversos períodos reproductivos.

La ultrasonografía Doppler aporta información acerca de la dirección, velocidad y características del flujo sanguíneo dentro del sistema cardiovascular, a partir de representaciones gráficas de los cambios en el flujo sanguíneo durante el ciclo cardíaco (Fielder y Baker, 1969). En base a la información brindada por dichas representaciones, llamadas espectros, el flujo arterial puede ser analizado mediante la cuantificación de velocidades e índices (Dickey, 1997). Dentro de estos, el más utilizado es el índice de

resistencia (IR), que relaciona la velocidad máxima y mínima dentro de cada ciclo cardíaco, y se calcula como  $IR = [(PVS - FFD) / PVS]$ ; donde PVS corresponde al pico de velocidad sistólica o velocidad máxima y FFD al flujo de fin de diástole, o la velocidad mínima que alcanza el flujo sanguíneo antes de que se produzca una nueva sístole (Dickey, 1997). Este índice refleja la resistencia al flujo sanguíneo de un lecho capilar que se encuentra distal al punto en el que se realiza la medición, indicando además, de manera indirecta, la cantidad de flujo que perfunde dicho lecho. Es decir que una alta resistencia vascular se asocia a un bajo aporte sanguíneo, mientras que este aporte aumenta a medida que la resistencia disminuye.

En medicina humana, esta técnica se ha venido aplicando en el monitoreo ginecológico y obstétrico de la mujer gestante desde 1977 (FitzGerald y Drumm, 1977). En las últimas décadas se ha comenzado a estudiar su aplicación en diversas especies domésticas, incluidos los caninos (Blanco y col., 2008). En esta especie, se ha descrito que a lo largo de la gestación, el IR de las arterias uterinas desciende progresivamente, asegurando una adecuada perfusión de las estructuras útero-placentarias (Di Salvo y col., 2006; Blanco y col., 2011a). Cabe destacar, que como en toda técnica diagnóstica, es necesario contar con rangos de referencia de parámetros Doppler que permitan aplicar dicha metodología en la clínica diaria (Bahlmann y col., 2012). Los cambios ultrasonográficos Doppler uterinos han sido descritos en hembras caninas gestantes de varias razas y tamaños, tales como perras Beagle (Nautrup, 1998), perras de talla grande (Di Salvo et al., 2006) y de varias tallas (Blanco et al., 2011a). Sin embargo, no se han descrito valores para los índices Doppler en hembras de razas pequeñas. Considerando la aumentada popularidad estas razas, sería de suma utilidad contar con valores determinados en esta población de perros facilitar su evaluación.

Durante la gestación, juntamente con los cambios adaptativos maternos en la circulación periférica, es necesario una adaptación estructural y funcional cardíaca para garantizar el progresivo requerimiento sanguíneo del útero (Blanco y col., 2011a). Se ha observado que la hembra canina gestante sufre una hipertrofia de las paredes ventriculares, sumado a un incremento progresivo de la función sistólica (Blanco y col., 2011a), además de diversos cambios electrofisiológicos que acompañan estos procesos (Blanco y col., 2012a).

La falta de desarrollo de muchos de estos cambios adaptativos, tanto a nivel cardíaco como en la circulación periférica, puede derivar en un final adverso de la gestación (como abortos o elevada mortalidad perinatal; Blanco y col, 2009; Blanco y col., 2011b). La aparición de estas fallas en la adaptación cardiovascular, puede ocurrir de manera precoz, inclusive antes de que otro tipo de signología clínica o ecográfica se manifieste. Por lo tanto, la detección temprana de esas fallas permitiría una intervención terapéutica adecuada para asegurar un normal desarrollo de la gestación (Blanco y col., 2012b).

El estudio de la vasculatura uterina mediante ultrasonografía Doppler en el puerperio normal ha sido descrito en distintas especies, entre ellas, humanos (Van Den Bosch y col. 2002; Van Schoubroeck y col. 2004; Mulic-Lutvica y col. 2007), bovinos (Krueger y col. 2009) y ratones (Wong y col. 2002). De la misma manera, el estudio de la función y estructura cardiovasculares, durante este período ha sido ampliamente reportado en la mujer (Zatuchni, 1951; Robson y col. 1987; Pandey y col. 2010), en bovinos (Neubert y Schäfer, 1977; Zarifi y col. 2012), caprinos (Olsson y col., 2001) y roedores (Wong y col., 2002; Poole y col., 2014). En la especie canina, el puerperio normal se ha estudiado desde el punto de vista anatómico e histopatológico (Al-Basaam, 1981, Orfanou y col. 2009) y ultrasonográfico (Yeager y Concannon 1990; Pharr y Post, 1992), pero la totalidad de los cambios cardiovasculares

adaptativos fisiológicos que tienen lugar durante esta etapa, no han sido descritos en detalle. La adecuada involución de las estructuras uterinas luego del parto es vital para asegurar una correcta fertilidad en los ciclos subsiguientes. En muchas especies mamíferas, principalmente en las de interés económico, como los bovinos, el puerperio ha sido objeto de muchos estudios, por su implicancia en la fertilidad posterior (Fourichon y col., 2000). Estableciendo como hipótesis, que en la perra los parámetros cardiovasculares se modifican luego del parto, el conocimiento integral de este estadio reproductivo podrá ser punto de partida para el diagnóstico precoz de enfermedades puerperales y su posterior tratamiento.

De la misma manera que la ultrasonografía Doppler ha demostrado ser útil en el diagnóstico precoz y seguimiento de alteraciones gestacionales, esta técnica ha sido utilizada para el estudio de enfermedades uterinas en la mujer y en la vaca (Tinkanen y Kujansuu, 1993; Alataş y col., 1996; Heppelmann y col., 2013). Las modificaciones en el flujo sanguíneo uterino en estas especies, detectables mediante ultrasonografía Doppler, son una consecuencia de los cambios producidos por diversos procesos inflamatorios (Özbay y Deveci, 2011). En la hembra canina, el complejo hiperplasia endometrial quística-piómetra (HEQ-P) es una condición patológica de alta prevalencia en nuestro medio. Es una entidad con alta morbilidad en hembras de edad media y avanzada, con importante implicancia clínica, que van desde infertilidad hasta estados infecciosos severos que pueden comprometer la vida de la perra (Smith 2006; Pretzer 2008). Aunque la caracterización del flujo sanguíneo uterino mediante ultrasonografía Doppler permitiría contribuir al diagnóstico precoz de la HEQ y piómetra, no se conocen aún en esta especie, las modificaciones de los distintos parámetros circulatorios que se asocian con estas enfermedades. Asumiendo que en la hembra canina, al igual que en otras especies, en los estados patológicos del útero existen variaciones de estos parámetros, es importante describir las modificaciones vasculares uterinas ocurridas en estos estados. Esto

permitiría elaborar un diagnóstico más detallado y establecer, según el caso, un pronóstico certero y posibles tratamientos.

Por todo lo expuesto, el objetivo general del presente trabajo de tesis fue contribuir al mejoramiento de la eficiencia reproductiva canina mediante la evaluación cardiovascular en distintas condiciones fisiológicas y patológicas uterinas de las hembras caninas. Para alcanzar dicho objetivo general, los objetivos específicos fueron:

1. Establecer mediante ultrasonografía Doppler, los rangos de referencia de valores del flujo sanguíneo uterino en la gestación canina normal de hembras de razas pequeñas.
2. Evaluar las arterias uterinas durante el puerperio canino por medio de ultrasonografía Doppler.
3. Analizar la estructura, función sistólica y electrofisiología cardíaca durante el puerperio en la perra.
4. Determinar los cambios en la estructura y el flujo sanguíneo del útero en enfermedades uterinas caninas de mayor ocurrencia, mediante ultrasonografía bidimensional y Doppler.

## **Referencias**

Alataş C, Aksoy E, Akarsu C, Yakin K, Bahçeci M. Hemodynamic assessment in pelvic inflammatory disease by transvaginal color Doppler ultrasonography. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1996; 70: 75-78.

Al-Bassam MA, Thompson RG, O'Donnell L. Normal postpartum involution of the uterus in the dog. *Can J Comp Med.* 1981; 45: 217-232.

- Bahlmann F, Fittschen M, Reinhard I, Wellek S, Steiner E. Reference values for blood flow velocity in the uterine artery in normal pregnancies from 18 weeks to 42 weeks of gestation calculated by automatic Doppler waveform analysis. *Ultraschall Med.* 2012; 33: 258-264.
- Bigliardi E, Prmigliani E, Cavirani S, Luppi A, Bonati L, Corradi A. Ultrasonography and cystic hyperplasia–pyometra complex in the bitch. *Reprod Domest Anim.* 2004; 39: 136–140.
- Blanco PG, Arias D, Rube A, Barrena JP, Corrada Y, Gobello C. An experimental model to study resistance index and systolic/diastolic ratio of uterine arteries in adverse canine pregnancy outcome. *Reprod Domest Anim.* 2009; 44: 164-166.
- Blanco PG, Arias DO, Gobello C. Doppler ultrasound in canine pregnancy. *J Ultrasound Med.* 2008; 27: 1745–1750.
- Blanco PG, Batista PR, Gómez FE, Arias DO, Gobello C. Echocardiographic and Doppler assessment of maternal cardiovascular function in normal and abnormal canine pregnancies. *Theriogenology.* 2012b; 78: 1235-1242.
- Blanco PG, Batista PR, Re NE, Mattioli GA, Arias DO, Gobello C. Electrocardiographic changes in normal and abnormal canine pregnancy. *Reprod Domest Anim.* 2012a; 47: 252-256.
- Blanco PG, Rodríguez R, Rube A, Arias DO, Tórtora M, Díaz JD, Gobello C. Doppler ultrasonographic assessment of maternal and fetal blood flow in abnormal canine pregnancy. *Anim Reprod Sci.* 2011b; 126: 130-135.
- Blanco PG, Tórtora M, Rodríguez R, Arias D, Gobello C. Ultrasonographic assessment of maternal cardiac function and peripheral circulation during normal gestation in dogs. *Vet J.* 2011a; 190: 154-59.

- Davidson AP, Baker TW. Reproductive ultrasound of the bitch and queen. *Top Companion Anim Med.* 2009; 24: 55–63.
- Di Salvo P, Bocci F, Polisca A. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in the bitch. *Res Vet Sci.* 2006; 81: 382–388.
- Dickey RP. Doppler ultrasound investigation of uterine and ovarian blood flow in infertility and early pregnancy. *Hum Reprod Update.* 1997; 3:467-503.
- England G, Yeager A, Concannon, PW. Ultrasound Imaging of the Reproductive Tract of the Bitch. En: Concannon PW, Verstegen J, England G, eds. *Recent Advances in Small Animal Reproduction.* Ithaca, NY: IVIS; 2003 (<http://www.ivis.org>), Document A1226.0303.
- England GC. Ultrasonographic assessment of abnormal pregnancy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1998; 28: 849-868.
- Fielder FD, Baker RF. Diagnostic applications of Doppler ultrasound. *Ultrasonics.* 1969; 7: 36–38.
- FitzGerald DE, Drumm JE. Non-invasive measurement of human fetal circulation using ultrasound: a new method. *Br Med J.* 1977; 2:1450-1451.
- Fourichon C, Seegers H, Malher X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology.* 2000; 53: 1729-1759.
- Heppelmann M, Weinert M, Brömmeling A, Piechotta M, Hoedemaker M, Bollwein H. The effect of puerperal uterine disease on uterine involution in cows assessed by Doppler sonography of the uterine arteries. *Anim Reprod Sci.* 2013; 143: 1-7.
- Krueger L, Koerte J, Tsousis G, Herzog K, Flachowsky G, Bollwein H. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during the first 12 weeks after parturition in healthy dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2009; 114: 23-31.

- Mulic-Lutvica A, Eurenus K, Axelsson O. Longitudinal study of Doppler flow resistance indices of the uterine arteries after normal vaginal delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007; 86: 1207-1214.
- Mulic-Lutvica A, Eurenus K, Axelsson O. Uterine artery Doppler ultrasound in postpartum women with retained placental tissue. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2009; 88: 724-728.
- Nautrup CP. Doppler ultrasonography of canine maternal and fetal arteries during normal gestation. *J Reprod Fertil.* 1998; 112: 301–314.
- Neubert C, Schäfer M. Untersuchungen zum EKG frischlaktierender Kühe, 1 Mitteilung: Das EKG in den ersten Wochen der Laktation und bei Eiweißüberangebot in der Ration. *Arch Exper Vet Med.* 1977; 31: 575-580.
- Olsson K, Hansson A, Hydbring E, von Walter LW, Häggstrom J. A serial study of heart function during pregnancy, lactation and the dry period in dairy goats using echocardiography. *Exp Physiol.* 2001; 86: 93-99.
- Orfanou DC, Ververidis HN, Pourlis A, Fragkou IA, Kokoli AN, Boscoc CM, Taitzoglou IA, Tzora A, Nerou CM, Athanasiou L, Fthenakis GC. Post-Partum Involution of the Canine Uterus – Gross Anatomical and Histological Features. *Reprod Dom Anim.* 2009; 44: 152–155.
- Özbay K, Deveci S. Relationships between transvaginal colour Doppler findings, infectious parameters and visual analogue scale scores in patients with mild acute pelvic inflammatory disease. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011; 156: 105-108.
- Pandey AK, Banerjee AK, Das A, Bhawani G, Kumar A, Majumadar B, Bhattacharya AK. Evaluation of maternal myocardial performance during normal pregnancy and post partum. *Indian Heart J.* 2010; 62: 64-67.
- Pharr JW, Post K. Ultrasonography and radiography of the canine postpartum uterus. *Vet*



Radiol Ultrasound. 1992; 33: 35-40.

Poole AT, Vincent KL, Olson GL, Patrikeev I, Saade GR, Stuebe A, Bytautiene E. Effect of lactation on maternal postpartum cardiac function and adiposity: a murine model. *Am J Obstet Gynecol.* 2014; 211:424.e1-7.

Pretzer S. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. *Theriogenology.* 2008; 70: 359–363.

Robson SC, Hunter S, Moore M, Dunlop W. Haemodynamic changes during the puerperium: a Doppler and M-mode echocardiographic study. *Br J Obstet Gynaecol.* 1987; 94: 1028-1039.

Smith FO. Canine pyometra. *Theriogenology.* 2006; 66: 610-612.

Tinkanen H, Kujansuu E. Doppler ultrasound findings in tubo-ovarian infectious complex. *J Clin Ultrasound.* 1993; 21: 175-178.

Van den Bosch T, Van Schoubroeck D, Lu C, De Brabanter J, Van Huffel S, Timmerman D. Color Doppler and gray-scale ultrasound evaluation of the postpartum uterus. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2002; 20: 586-591.

Van Schoubroeck D, Van den Bosch T, Scharpe K, Lu C, Van Huffel S, Timmerman D. Prospective evaluation of blood flow in the myometrium and uterine arteries in the puerperium. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004; 23: 378-381.

Wong AY, Kulandavelu S, Whiteley KJ, Qu D, Langille BL, Adamson SL. Maternal cardiovascular changes during pregnancy and postpartum in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282: 918-925.

Yeager AE, Concannon PW. Serial ultrasonographic appearance of postpartum uterine involution in beagle dogs. *Theriogenology.* 1990; 34: 523-525.

Yeager AE, Mohammed HO, Meyers-Wallen V, Vannerson L, Concannon PW.

Ultrasonographic appearance of the uterus, placenta, fetus, and fetal membranes

throughout accurately timed pregnancy in beagles. *Am J Vet Res.* 1992; 53: 342-351.

Zarifi M, Buczinski S, Rezakhani A, Mokhber Dezfouli MR, Khonsha A. Effect of lactation

on functional and morphological echocardiographic variables in adult dairy cows. *J Vet*

*Cardiol.* 2012; 14: 415-421.

Zatuchni J. The electrocardiogram in pregnancy and puerperium. *Am Heart J.* 1951; 42: 11–

17.

## CAPÍTULO I

### **Rango de referencia del índice de resistencia de la arteria uterina durante la gestación en hembras caninas de razas pequeñas**

#### **Introducción**

La ultrasonografía Doppler es una técnica de diagnóstico no invasiva que permite estudiar las características del flujo sanguíneo (Dickey, 1997; Blanco y col., 2008). Esta técnica, que se ha venido empleando para el estudio de la circulación útero - placentaria en la mujer desde 1968 (Bishop, 1968), ha tenido un crecimiento exponencial de su aplicabilidad en medicina obstétrica en caninos domésticos durante los últimos años (Di Salvo y col., 2006; Blanco y col., 2008; Miranda y Domingues, 2010).

En los mamíferos se produce, durante la gestación, un descenso progresivo del índice de resistencia (IR) de las arterias uterinas que asegura una adecuada perfusión del *conceptus* (Dickey, 1997; Nautrup, 1998). En la perra, dicha disminución del IR se produce a partir del día 30 de gestación hasta el final de la misma (Blanco y col., 2011a).

En caninos, al igual que en la mujer, se ha demostrado que la deficiencia en este mecanismo adaptativo se asocia a un alto riesgo de muerte fetal y perinatal (Dickey 1997; Papageorghiou y col., 2004; Blanco y col., 2011b). Sumado a esto, la aparición de las alteraciones en el IR parece ocurrir incluso antes de que se manifiesten otros indicios de anomalía gestacional (Blanco y col., 2011b).

Debido a su eficiencia para detectar tempranamente desenlaces gestacionales adversos, esta técnica se ha convertido en una herramienta de uso rutinario para la identificación de compromiso fetal en medicina humana (Papageorghiou y col., 2004; Duerloo y col., 2007). El potencial diagnóstico de este método depende de la disponibilidad de rangos de referencia que permitan alertar cuando el IR presente valores límite o fuera del rango (Kurmanavicius y col., 1997; Bahlmann y col., 2012).

En caninos, los trabajos realizados hasta el momento en gestación normal han incluido un reducido número de perras Beagle (Nautrup, 1998), perras de talla grande (Di Salvo y col, 2006) o de varias tallas (Blanco y col, 2011a). Sin embargo, no hay estudios realizados en hembras de razas pequeñas específicamente (American Kennel Club, 2016).

Por lo expuesto, los objetivos de este estudio fueron describir los cambios en el flujo de la arteria uterina durante la gestación normal en hembras caninas de razas pequeñas y determinar el rango de referencia para el IR en estas perras.

## **Materiales y métodos**

### *Animales y seguimiento*

Se incluyeron en este estudio 52 hembras caninas preñadas de razas pequeñas (27 Caniches Toy, 10 Yorkshire Terrier, 5 Malteses, 4 Dachshund Miniatura, 2 Chihuahuas, 2 Schnauzer Miniatura y 2 Bichón Frisé) de  $3,5 \pm 0,2$  (1-6) años de edad, con un peso de  $3,7 \pm 0,1$  (1,5-6,5) kg y un historial de  $3,1 \pm 0,27$  (1-5) pariciones previas sin complicaciones. Se evaluó a las hembras cada 10 días, desde el día 30 del ciclo estral hasta el momento del parto. Se definió al

día 0 como el primer día en el cual la citología vaginal presentó un patrón típico de estro (Olson y col., 1984).

#### *Evaluación del flujo sanguíneo uterino*

Las evaluaciones ultrasonográficas bidimensional y Doppler se llevaron a cabo con un transductor lineal de 7,5 – 8 MHz (Toshiba Core Vision Pro, Japón). Se posicionó a las hembras en decúbito lateral y se aplicó gel acústico sobre la piel previamente rasurada. Se localizó el cuerpo uterino en un eje transversal a nivel de la entrada de la pelvis, y con Doppler color se detectaron las arterias uterinas derecha e izquierda a ambos lados del mismo. Con Doppler pulsado se obtuvo el trazado espectral del flujo arterial (Alvarez-Clau y Liste, 2005), a partir del cual se midieron la velocidad de pico sistólico (VPS; m/s) y el flujo de fin de diástole (FFD; m/s). El IR se calculó automáticamente como  $(VPS-FFD)/VPS$  (Dickey, 1997).

#### *Análisis estadístico*

Se corroboró la distribución normal de los datos mediante el test de Kolmogorov–Smirnov. Se comparó el VPS, FFD e IR de las arterias uterinas derecha e izquierda mediante el test de Student. Estos valores fueron además analizados mediante un ANOVA de medidas repetidas, seguido por un test de Tukey, usando como covariable la edad y el peso de la hembra, el tamaño de la camada y el número de gestaciones previas.

Los rangos de referencia para el IR se construyeron a partir de la regresión de este índice con la edad gestacional (EG). Se ajustó el polinomio a la media y se obtuvo la información del

desvío estándar a partir de los residuos asociados a la curva. Los polinomios obtenidos se utilizaron para el cálculo de la media y percentiles 2,5 (P2,5) y 97,5 (P97,5) para cada EG (Royston, 1991; Wright y Royston, 1997). Se consideró como significativo un valor de  $p < 0,05$  (SPSS, SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

## Resultados

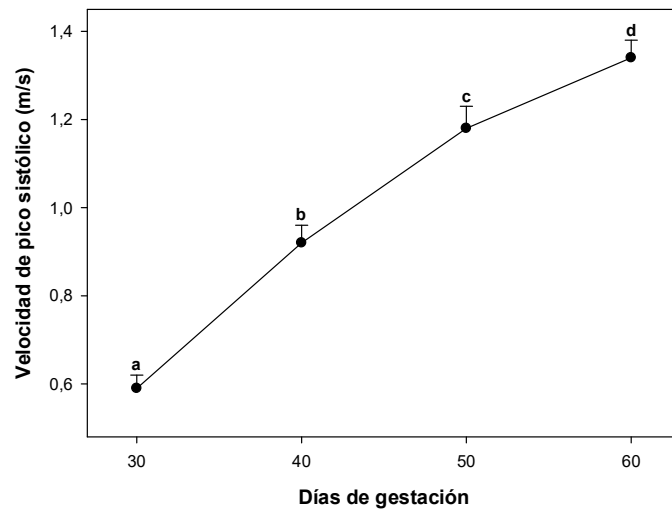
Todas las hembras parieron normalmente entre 2 y 6 cachorros. No se encontraron diferencias para el VPS, FFD e IR entre las arterias uterinas derecha e izquierda ( $p > 0,1$ ), por lo tanto, se promediaron los valores de ambos vasos. Se observó un incremento gradual del VPS ( $p < 0,01$ ; Fig. 1) y del FFD ( $p < 0,01$ ; Fig. 2) y una disminución progresiva del IR ( $p < 0,01$ ) durante el estudio. El tamaño de camada influyó sobre el VPS y FFD ( $p < 0,05$ ), pero no sobre el IR ( $p > 0,1$ ). Las velocidades tuvieron valores más altos en las camadas más numerosas.

Asimismo la edad, el peso de las hembras y el número de partos previos no influyeron en el VPS, FFD e IR ( $p > 0,1$ ).

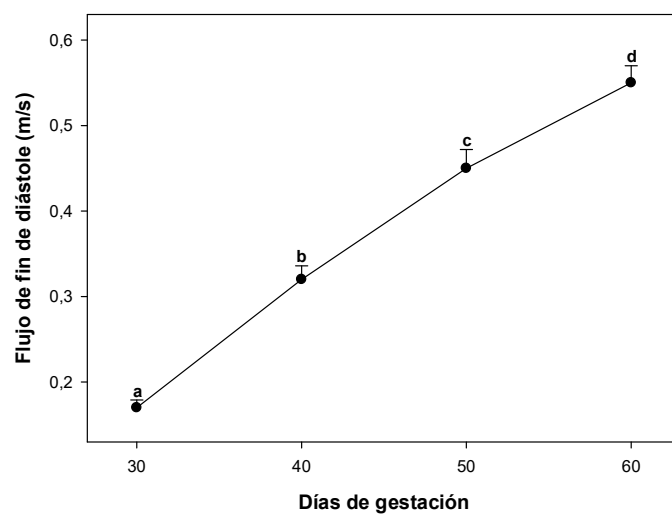
Un polinomio de segundo grado describió la relación entre el IR de la arteria uterina y la EG en las diferentes instancias de evaluación:

$$[\text{IR} = 0,993 + 8,4 \times 10^{-5} \times \text{EG}^2 - 0,0117 \times \text{EG}]$$

Los valores de referencia estimados para la media y percentiles 2,5 y 97,5 para los días 30, 40, 50 y 60 de gestación, se presentan en la Tabla 1.



**Figura 1:** Velocidad de pico sistólico (media±EEM) de las arterias uterinas de 52 hembras caninas de raza pequeña evaluadas cada 10 días entre los días 30 y 60 de gestación. Las letras indican diferencias de  $p < 0,05$  entre los distintos días de observación.



**Figura 2:** Flujo de fin de diástole (media±EEM) de las arterias uterinas de las mismas hembras caninas de la Figura 1. Las letras indican diferencias de  $p < 0,01$  entre los distintos días de observación.

**Tabla 1:** Media y percentiles 97,5 (P97,5) y 2,5 (P2,5) estimados para el índice de resistencia (IR) de las arterias uterinas de 52 hembras caninas de razas pequeñas, evaluadas cada 10 días desde los días 30 a 60 de gestación. Las letras en superíndice indican la diferencia  $p < 0,01$  entre semanas.

		Días de gestación			
		30	40	50	60
IR	Media	0,72 <sup>a</sup>	0,66 <sup>b</sup>	0,62 <sup>c</sup>	0,59 <sup>d</sup>
	P97,5	0,84	0,79	0,76	0,69
	P2,5	0,60	0,53	0,48	0,49

## Discusión

Como se esperaba, en este estudio se observó un incremento progresivo del VPS y FFD durante la gestación, mientras que el IR disminuyó hasta el parto en perras de razas pequeñas. Estos hallazgos están en línea con reportes previos en caninos (Di Salvo y col., 2006; Blanco y col., 2011a). Sin embargo, los valores de IR hallados en este estudio en razas pequeñas fueron mayores a los reportados en perras Beagle (Nautrup, 1998) y en perras de talla grande (Di Salvo y col., 2006). Esto sugiere que a pesar de que el flujo sanguíneo uterino tiene un comportamiento similar en distintos ejemplares de la especie, el IR presenta variaciones en función del tamaño de las hembras. Esto exige el desarrollo de estudios que abarquen grupos homogéneos de distintas tallas y razas para asegurar la óptima utilización de esta herramienta diagnóstica.



El descenso en la resistencia vascular uterina se puede explicar por el efecto aditivo de varios mecanismos fisiológicos. En la mujer gestante se describió una invasión trofoblástica de las arterias espirales, un incremento en la distensibilidad vascular y un aumento de disponibilidad de un potente vasodilatador, el óxido nítrico, como responsables de la disminución del IR durante el embarazo (Bahlmann y col., 2012; Simmons y col., 2000). Procesos de similares características podrían explicar el descenso del IR de las arterias uterinas durante la gestación canina (Miranda y Domingues, 2010; Blanco y col., 2011a).

Las hembras que presentaron camadas más numerosas mostraron valores mayores de VPS y FFD. Esto se debe a que un mayor número de fetos produce un incremento en la superficie a irrigar, lo que se ve reflejado en el aumento de ambas velocidades (Dickey, 1997; Burns, 1998). El IR es la relación entre dichas velocidades, por lo que el aumento proporcional de las mismas no lo modificó. Como consecuencia, el tamaño de la camada no influyó sobre el IR. Esto contrasta con lo descrito en mujeres, donde las gestaciones gemelares presentan un IR de la arteria uterina menor que las gestaciones simples (Geipel y col., 2011). En especies domésticas monotocas, la gestación única cursa con valores de IR mayores en la arteria contralateral del cuerno donde se encuentra el feto, mostrando el efecto del tamaño de camada en la perfusión uterina (Bollwein y col., 2002; Ferreira y col., 2015; Klewitz y col., 2015). Sin embargo, esta diferencia entre arteria uterina derecha e izquierda no pudo comprobarse en el presente estudio debido a que ninguna de las perras incluidas presentó un feto único (England 1998).

En caninos, se ha reportado que la edad de la hembra puede influir en el IR de las arterias uterinas durante el estro y los primeros días de la fase luteal (Freeman y col., 2013), pero no hay reportes acerca de la relación entre edad e IR durante la gestación.

En este trabajo, la falta de efecto de la edad y número de gestaciones previas sobre la progresión del IR durante la gestación puede asociarse a la homogeneidad del grupo estudiado. Se requieren más estudios con perras de diferentes edades y pariciones para saber si estos pueden afectar el comportamiento del IR.

El conocimiento de los intervalos de referencia del IR aporta una herramienta diagnóstica que permite alertar acerca de posibles alteraciones que deriven en un desenlace gestacional adverso en aquellas hembras donde el IR se encuentra por encima del P97,5. A partir de este valor, o inclusive valores que rondan los percentiles 90 o 95, podrán establecerse protocolos de seguimiento para evaluar el comportamiento del IR a lo largo de la gestación. Esto permitirá intervenir, de ser necesario, para asegurar un adecuado desarrollo gestacional, evitando la pérdida de crías (Detti y col., 2002; Cnossen y col., 2008; Blanco y col., 2011c). Se concluye que el flujo sanguíneo uterino se incrementó progresivamente durante la gestación en hembras de razas pequeñas. Adicionalmente, los rangos de referencia para el IR en estas razas fueron de 0,60 a 0,84 para el día 30, de 0,53 a 0,79 para el día 40, de 0,48 a 0,76 para el día 50 y de 0,49 a 0,69 para el día 60.

## Referencias

Alvarez-Clau A, Liste F. Ultrasonographic characterization of the uterine artery in the nonestrus bitch. *Ultrasound Med. Biol.* 2005; 3: 583–587.

American Kennel Club [Internet]. Estados Unidos: AKC; 2016 (Citado en marzo de 2016).

Disponible en: <http://www.akc.org/dog-breeds/>

- Bahlmann F, Fittschen M, Reinhard I, Wellek S, Steiner E. Reference values for blood flow velocity in the uterine artery in normal pregnancies from 18 weeks to 42 weeks of gestation calculated by automatic Doppler waveform analysis. *Ultraschall Med.* 2012; 33: 258-264.
- Bishop EH. Ultrasonic fetal monitoring. *Clin Obstet Gynecol.* 1968; 11: 1154-1164.
- Blanco P, Rube A, Batista P, Villanueva M, Arias D, Gobello C. Doppler de arterias uterinas en el diagnóstico de la preñez canina patológica: reporte de un caso. Séptimas Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica, 2011c, Mar del Plata, Argentina.
- Blanco PG, Arias DO, Gobello C. Doppler ultrasound in canine pregnancy. *J Ultrasound Med.* 2008; 27: 1745–1750.
- Blanco PG, Rodríguez R, Rube A, Arias DO, Tórtora M, Díaz JD, Gobello C. Doppler ultrasonographic assessment of maternal and fetal blood flow in abnormal canine pregnancy. *Anim Reprod Sci.* 2011b; 126: 130-135.
- Blanco PG, Tórtora M, Rodríguez R, Arias D, Gobello C. Ultrasonographic assessment of maternal cardiac function and peripheral circulation during normal gestation in dogs. *Vet J.* 2011a; 190: 154-159.
- Bollwein H, Baumgartner U, Stolla R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during pregnancy. *Theriogenology.* 2002; 57: 2053-2061.
- Burns P. Interpretación y análisis del estudio Doppler. En: Taylor K, Burns P y Wells P, Doppler. 2da edición. Madrid, España, Ed Marban, 1998, p. 55-98.
- Cnossen JS, Morris RK, ter Riet G, Mol BW, van der Post JA, Coomarasamy A, Zwinderman AH, Robson SC, Bindels PJ, Kleijnen J, Khan KS. Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. *CMAJ.* 2008; 178: 701-711.

- Detti L, Akiyama M, Mari G. Doppler blood flow in obstetrics. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2002; 14: 587-593.
- Deurloo KL, Spreeuwenberg MD, Bolte AC, Van Vugt JM. Color Doppler ultrasound of spiral artery blood flow for prediction of hypertensive disorders and intra uterine growth restriction: a longitudinal study. *Prenat Diagn.* 2007; 27: 1011-1016.
- Di Salvo P, Bocci F, Polisca A. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in the bitch. *Res Vet Sci.* 2006; 81: 382–388.
- Dickey RP. Doppler ultrasound investigation of uterine and ovarian blood flow in infertility and early pregnancy. *Hum Reprod Update.* 1997; 3: 467-503.
- England GCW. Ultrasonographic assessment of abnormal pregnancy. *Ultrasonography.* 1998; 28: 849–867.
- Ferreira JC, Canesin HS, Ignácio FS, Rocha NS, Pinto CR, Meira C. Effect of age and endometrial degenerative changes on uterine blood flow during early gestation in mares. *Theriogenology.* 2015; 84: 1123-1130.
- Freeman SL, Russo M, England GC. Uterine artery blood flow characteristics assessed during oestrus and the early luteal phase of pregnant and non-pregnant bitches. *Vet J.* 2013; 197: 205-210.
- Geipel A, Hennemann F, Fimmers R, Willruth A, Lato K, Gembruch U, Berg C. Reference ranges for Doppler assessment of uterine artery resistance and pulsatility indices in dichorionic twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011; 37: 663-667.
- Klewitz J, Struebing C, Rohn K, Goergens A, Martinsson G, Orgies F, Probst J, Hollinshead F, Bollwein H, Sieme H. Effects of age, parity, and pregnancy abnormalities on foal birth weight and uterine blood flow in the mare. *Theriogenology.* 2015; 83: 721-729.

- Kurmanavicius J, Florio I, Wisser J, Hebisch G, Zimmermann R, Müller R, Huch R, Huch A. Reference resistance indices of the umbilical, fetal middle cerebral and uterine arteries at 24-42 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1997 Aug;10(2):112-20.
- Miranda SA, Domingues SF. *Conceptus* ecobiometry and triplex Doppler ultrasonography of uterine and umbilical arteries for assessment of fetal viability in dogs. *Theriogenology.* 2010 Sep 1;74(4):608-617.
- Nautrup CP. Doppler ultrasonography of canine maternal and fetal arteries during normal gestation. *J Reprod Fertil.* 1998; 112: 301–314.
- Olson PN, Husted PW, Allen TA, Nett TM. Reproductive endocrinology and physiology of the bitch and queen. *Vet Clin North Am Small Anim Pract..* 1984; 14: 927–946.
- Papageorghiou AT, Yu CK, Nicolaidis KH. The role of uterine artery Doppler in predicting adverse pregnancy outcome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004; 18: 383-396.
- Royston P. Constructing time-specific reference ranges. *Stat Med.* 1991; 10: 675-690.
- Simmons LA, Hennessy A, Gillin AG, Jeremy RW. Uteroplacental blood flow and placental vascular endothelial growth factor in normotensive and pre-eclamptic pregnancy. *BJOG.* 2000; 107: 678-685.
- Wright EM, Royston P. Simplified estimation of age-specific reference intervals for skewed data. *Stat Med.* 1997; 16: 2785-2803.

## CAPÍTULO II

### **Evaluación ultrasonográfica Doppler de las arterias uterinas durante el puerperio canino normal**

#### **Introducción**

En los mamíferos, el puerperio es el periodo fisiológico en el que se produce la involución de los órganos reproductivos luego del parto, preparando a la hembra para retornar a la ciclicidad (Mulit-Lutvica y col., 2001; Orfanou y col., 2009). En caninos, el puerperio se caracteriza clínicamente por una descarga vulvar durante 4 a 7 semanas posparto (Dickie y Arbeiter, 1993; Feldman y Nelson, 2004; Orfanou y col., 2008). Incluso la presencia de sitios placentarios y células tipo trofoblásticas ha sido considerada como una característica histológica normal de la involución uterina posparto hasta el día 84 (Al-Bassam y col., 1981a; Orfanou y col., 2009).

Existen solamente dos reportes ultrasonográficos de la involución uterina durante el puerperio canino normal. Por un lado, Pharr y Post (1992) describieron estos cambios durante los primeros 24 días posparto, y por el otro, Yeager y Concannon (1990) estudiaron la forma, ecogenicidad y diámetro uterino durante 15 semanas. Según dichos reportes, inmediatamente luego del parto, el útero se encuentra aumentado de tamaño y ecogénico, con paredes gruesas e irregulares (Pharr y Post, 1992). A medida que transcurren las semanas, se produce una involución prolongada y gradual del útero (Yeager y Concannon 1990), que excede los tiempos de la involución histológica (Al-Bassam y col., 1981a).

La ultrasonografía Doppler ha sido utilizada para estudiar el flujo sanguíneo uterino en diversas especies domésticas, incluyendo caninos (Blanco y col., 2008). En la perra, el índice de resistencia (IR) de las arterias uterinas decrece durante la gestación normal, asegurando una adecuada perfusión de las estructuras útero-placentarias (Nautrup, 1998; Di Salvo y col., 2006; Blanco y col., 2011a). Sin embargo, en casos de gestación anormal, dicho índice puede no descender o incluso puede aumentar (Blanco y col., 2011b).

Los cambios vasculares uterinos durante el puerperio han sido reportados en mujeres (Jaffa y col., 1996; Mulit-Lutvica y col., 2007), vacas (Krueger y col., 2009) y yeguas (Mortensen y col., 2011). En estas especies, se encontró un incremento progresivo del IR durante el período posparto. Inversamente, el IR de las arterias uterinas no se modificó luego del parto en mujeres que padecían endometritis puerperal, subinvolución uterina, retención placentaria o alteraciones en la herida luego de una cesárea (Nakai y col., 1997; Kirkinen y col., 1988; Mulit-Lutvica y col., 2009).

La caracterización del flujo sanguíneo uterino luego del parto mediante ultrasonografía Doppler probablemente contribuya a un diagnóstico precoz de las enfermedades posparto. Sin embargo, esta técnica no se ha desarrollado aún en caninos. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue describir los cambios en el flujo sanguíneo de las arterias uterinas mediante ultrasonografía Doppler durante el puerperio canino normal.

## **Materiales y métodos**

### *Animales*

Se incluyeron en este estudio veinte hembras caninas de razas puras (11 Poodle Toy, 5 Yorkshire Terrier, 2 Malteses y 2 Bichón Frisé) clínicamente sanas, de 2 a 5 ( $3,85\pm 0,16$ ) años de edad y un peso de 2 a 6 ( $3,8\pm 0,24$ ) kg. La preñez se confirmó mediante ultrasonografía bidimensional en cada uno de los casos (día -3; England y col., 2003). Todas las hembras fueron múltiparas y con antecedentes de pariciones normales.

### *Seguimiento ultrasonográfico*

Cada una de las hembras fue evaluada el día -3, y luego los días 3, 10, 17, 24, 38, 52 y 80, considerando el parto como el día 0. Las evaluaciones ultrasonográficas bidimensionales y Doppler se llevaron a cabo con un transductor lineal (Toshiba Core Vision Pro, Japón) de 7,5 a 8 MHz. Se posicionó a las hembras en decúbito lateral y se aplicó gel acústico sobre la piel previamente rasurada.

Se localizó el cuerpo del útero mediante ultrasonografía bidimensional en un corte transversal, a nivel de la entrada de la pelvis (Davidson y Baker, 2009). En cada una de las instancias de evaluación, se midieron los cuernos uterinos inmediatamente después de la bifurcación del cuerpo uterino (Yeager y Concannon, 1990). Se obtuvieron el diámetro total máximo (DT; mm) y el espesor endometrial (E; mm), en un corte transversal del cuerno uterino (Yeager y Concannon, 1990). El endometrio fue identificado como un anillo moderadamente ecogénico, rodeado por un anillo hipoecogénico correspondiente al miometrio (Pharr y Post, 1992).

Se utilizó Doppler color para localizar las arterias uterinas a ambos lados del cuerpo uterino y Doppler pulsado para obtener los espectros correspondientes a cada arteria (Álvarez-Clau y Liste, 2005). Se corrigió manualmente el ángulo de insonación según reportes previos (Köster y col., 2001; Di Salvo y col., 2006), considerando únicamente medidas obtenidas con un



ángulo menor a 20°. Con el cáliper electrónico del ecógrafo se midieron la velocidad del pico sistólico (VPS; m/s) y el flujo de fin de diástole (FFD; m/s) a partir de los cuales se calculó el índice de resistencia como  $IR = [(VPS - FFD) / VPS]$  (Dickey, 1997).

### *Análisis estadístico*

Se compararon los valores de VPS, FFD e IR de las arterias uterinas derecha e izquierda mediante un test de Student. Los valores de DT, E, VPS, FFD e IR se analizaron mediante un ANOVA de medidas repetidas, seguido por un test de Tukey, usando como covariable el tamaño de la camada (SPSS 19.0; SPSS, Chicago, IL, USA). Finalmente, se correlacionó al IR con el DT y el E, mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Se consideró como significativo un valor de  $p < 0,05$ .

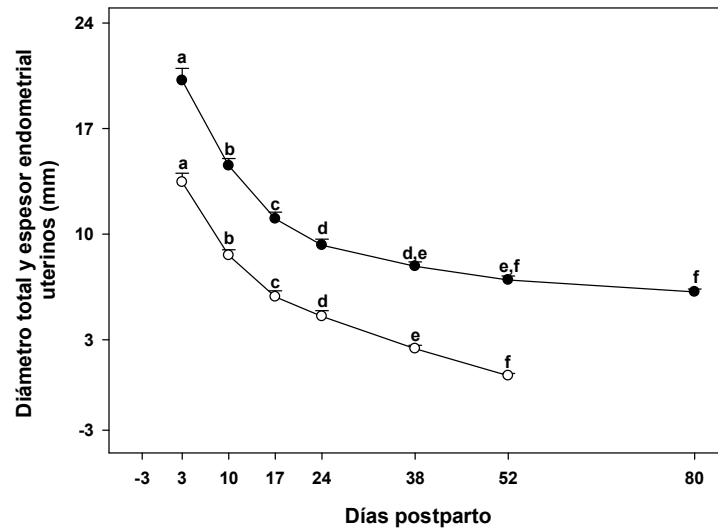
## **Resultados**

Todas las hembras parieron con normalidad 2 a 6 ( $3,55 \pm 0,98$ ) cachorros sanos y presentaron un puerperio sin complicaciones (Orfanou y col., 2008). Los cachorros fueron destetados 60 días luego del parto. El registro original de las ondas Doppler de la arteria uterina izquierda se muestra en la Fig. 1. Tanto el DT ( $p < 0,01$ ) como el E ( $p < 0,01$ ) disminuyeron progresivamente durante el curso del puerperio (Fig. 2). El endometrio pudo identificarse ultrasonográficamente hasta los días 38 y 52 en 9 y 11 perras, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en la VPS, FFD e IR entre las arterias uterinas derecha e izquierda, por lo tanto se promediaron ambos valores.

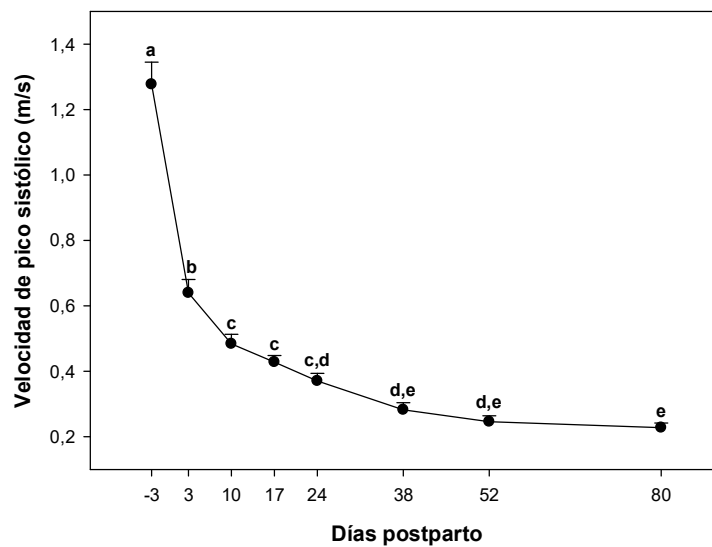
Se observó una disminución gradual del VPS ( $p < 0,01$ ; Fig. 3) y del FFD ( $p < 0,01$ ; Fig. 4), mientras que el IR aumentó progresivamente durante el período de estudio ( $p < 0,01$ ; Fig. 5). Se encontró una correlación negativa entre el IR y el DT ( $r = -0,59$ ;  $p < 0,01$ ) y entre el IR y el E ( $r = -0,58$ ;  $p < 0,01$ ). No se observó ningún efecto del tamaño de la camada en el VPS, FFD e IR ( $p > 0,1$ ).



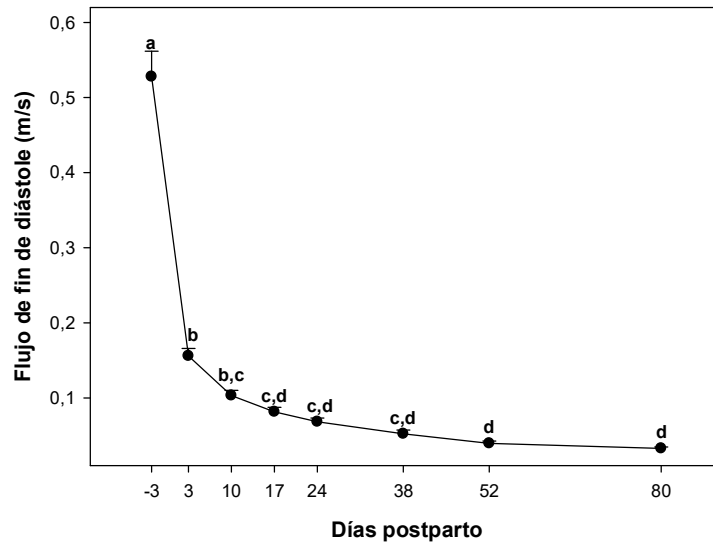
**Figura 1:** Ondas Doppler de la arteria uterina izquierda (flecha blanca) localizada con Doppler color en el lateral del cuerpo uterino (flecha verde) de una hembra Yorkshire Terrier al día 24 posparto. VPS: velocidad de pico sistólico y FFD: flujo de fin de diástole.



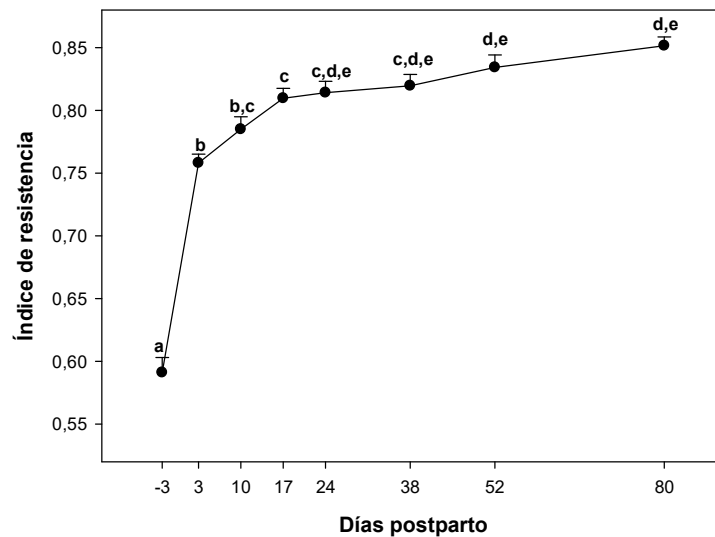
**Figura 2:** Diámetro total uterino (DT; media±EEM; círculos negros) y espesor endometrial (E; media±EEM; círculos blancos) de 20 hembras caninas durante el puerperio normal. Las diferentes letras indican diferencias de  $p < 0,05$  entre las semanas.



**Figura 3:** Velocidad de pico sistólico (VPS; media±EEM) de las arterias uterinas de las mismas hembras caninas de la Figura 2. Las diferentes letras indican diferencias de  $p < 0,05$  entre las semanas.



**Figura 4:** Flujo de fin de diástole (FFD; media±EEM) de las arterias uterinas de las mismas hembras caninas de la Figura 2. Las diferentes letras indican diferencias de  $p < 0,05$  entre las semanas.



**Figura 5:** Índice de resistencia (media±EEM) de las arterias uterinas de las mismas hembras caninas de la Figura 2. Las diferentes letras indican diferencias de  $p < 0,05$  entre las semanas.

## Discusión

En el transcurso de este estudio, tanto las dimensiones uterinas como el flujo sanguíneo uterino disminuyeron progresivamente. Estos hallazgos coinciden con los cambios regenerativos uterinos en las estructuras epiteliales y glandulares, previamente descritos en el puerperio canino (Chu y col., 2002; Orfanou y col., 2009).

La disminución del diámetro uterino está en línea con reportes previos en perros (Yeager y Concannon, 1990). Sin embargo, a diferencia del reporte de Yeager y Concannon (1990) donde la capa ultrasonográfica correspondiente al espesor endometrial se observó hasta el día 100 posparto, en el presente trabajo dicha capa pudo distinguirse hasta el día 52. La imposibilidad de detectar el endometrio a partir del día 80 está en concordancia con estudios histopatológicos, en los que la involución de los sitios placentarios se encontró casi completa al comienzo de la semana 8 (Día 56) luego del parto (Al-Bassam y col., 1981a), momento en el cual el endometrio se encuentra compuesto por una única capa de células epiteliales columnares. Las discrepancias con lo reportado por Yeager y Concannon (1990) pueden deberse a las diferencias en el tamaño materno y de la camada. Los hallazgos de este estudio parecen confirmar que la involución ultrasonográfica ocurre antes que la involución histológica previamente reportada (día 84, Al-Bassam y col., 1981a; Orfanou y col., 2009). Como era de esperar, en estos animales el flujo sanguíneo de las arterias uterinas disminuyó durante el puerperio normal, manifestado como una disminución del VPS y del FFD y un aumento del IR. Este incremento fue marcado durante la primera semana posparto y moderado pero sostenido hacia el final del estudio, lo que coincide con reportes previos en otras especies (Jaffa y col., 1996; Mulit-Lutvica y col., 2007; Krueger y col., 2009, Mortensen y col., 2011). Este comportamiento bifásico puede ser explicado por el descenso abrupto de la

demanda de sangre durante los primeros días luego del parto. Asimismo, la remodelación de las arterias uterinas por una hipertrofia excéntrica es un evento gestacional caracterizado por el incremento de la luz arterial, que fue descrito en ratas (Cipolla y Osol, 1994), ratones (van der Heijden y col., 2004) y ovejas (Annibale y col., 1989). La involución de esa hipertrofia durante el puerperio lleva a una disminución del flujo sanguíneo arterial uterino (van der Heijden y col., 2009). Un evento similar podría ocurrir en caninos, aunque aún no se ha reportado.

A pesar de que el IR de las arterias uterinas no se modificó desde el día 24 hasta el final del estudio, los valores encontrados en las últimas semanas fueron más bajos que aquellos reportados previamente para el anestro canino (Álvarez-Clau y Liste, 2005), sugiriendo que existe un lento retorno a las condiciones de ingravidez. Una situación similar pudo ser observada en mujeres y vacas, en las que el aumento de la resistencia de las arterias uterinas se extendió más allá de la involución clínica uterina (Tekay y Jouppila, 1993; Jaffa y col., 1996; Krueger y col. 2008).

Finalmente, la ultrasonografía Doppler parece ser una herramienta útil para la evaluación de los cambios en el flujo sanguíneo de la arteria uterina durante el puerperio canino. Incluso se ha demostrado que esta técnica contribuye con el diagnóstico de diversas alteraciones puerperales en bovinos (Heppelmann y col., 2013). En caninos, se necesitan estudios adicionales para evaluar la aplicación de esta técnica en la detección temprana de desórdenes puerperales, como la subinvolución de sitios placentarios (Al-Bassam y col., 1981b; Fernandez y col., 1998). Se concluye que durante el puerperio canino normal se produce una disminución del flujo sanguíneo de las arterias uterinas asociada a la regresión ultrasonográfica bidimensional del útero.

## Referencias

- Al-Bassam MA, Thompson RG, O'Donnell L. Normal postpartum involution of the uterus in the dog. *Can J Comp Med.* 1981a; 45: 217-232.
- Al-Bassam MA, Thompson RG, O'Donnell L. Involution abnormalities in the postpartum uterus of the bitch. *Vet Pathol.* 1981b; 18: 208-218.
- Alvarez-Clau A, Liste F. Ultrasonographic characterization of the uterine artery in the nonestrus bitch. *Ultrasound Med Biol.* 2005; 3: 583–587.
- Annibale DJ, Rosenfeld CR, Kamm KE. Alterations in vascular smooth muscle contractility during ovine pregnancy. *Am J Physiol.* 1989; 256: 1282-1288.
- Batista PR, Blanco PG, Tórtora M, Arias DO, Corrada YA, Gobello C, 2012. Doppler ultrasonographic assessment of uterine arteries during normal canine puerperium. En: *Proceedings of the 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*, Whistler, Canadá, pp. 17-18
- Blanco PG, Arias DO, Gobello C. Doppler ultrasound in canine pregnancy. *J Ultrasound Med.* 2008; 27: 1745–1750.
- Blanco PG, Rodríguez R, Rube A, Arias DO, Tórtora M, Díaz JD, Gobello C. Doppler ultrasonographic assessment of maternal and fetal blood flow in abnormal canine pregnancy. *Anim Reprod Sci.* 2011b; 126: 130-135.
- Blanco PG, Tórtora M, Rodríguez R, Arias D, Gobello C. Ultrasonographic assessment of maternal cardiac function and peripheral circulation during normal gestation in dogs. *Vet J.* 2011a; 190: 154-159.
- Chu PY, Salamonsen LA, Lee CS, Wright PJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in the

- endometrium of bitches. *Reproduction*. 2002; 123: 467-477.
- Cipolla M, Osol G. Hypertrophic and hyperplastic effects of pregnancy on the rat uterine arterial wall. *Am J Obstet Gynecol*. 1994; 171: 805-811.
- Davidson AP, Baker TW. Reproductive ultrasound of the bitch and queen. *Top Companion Anim Med*. 2009; 24: 55-63.
- Di Salvo P, Bocci F, Polisca A. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in the bitch. *Res Vet Sci*. 2006; 81: 382–388.
- Dickey RP. Doppler ultrasound investigation of uterine and ovarian blood flow in infertility and early pregnancy. *Hum Reprod Update*. 1997; 3: 467-503.
- Dickie MB, Arbeiter K. Diagnosis and therapy of the subinvolution of placental sites in the bitch. *J. Reprod Fertil Suppl*. 1993; 47: 471-475.
- England G, Yeager A, Concannon PW. Ultrasound Imaging of the Reproductive Tract of the Bitch. En: Concannon PW, Verstegen J, England G, eds. *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Ithaca, NY: IVIS; 2003 (<http://www.ivis.org>), Documento A1226.0303.
- Feldman EC, Nelson RW, eds, 2004. Breeding, pregnancy and parturition. En: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, Saunders, Philadelphia, pp. 775-776.
- Fernández PE, Portiansky EL, Barbeito CG, Gimeno EJ. Characterisation of cytotrophoblastic-like cells present in subinvolutioned placental sites of the bitch. *Histol Histopathol*. 1998; 13: 995-1000.
- Fielder FD, Baker RF. Diagnostic applications of Doppler ultrasound. *Ultrasonics*. 1969; 7: 36–38.



- Jaffa AJ, Wolman I, Har-Toov J, Amster R, Peyser MR. Changes in uterine artery resistance to blood flow during puerperium- a longitudinal study. *J Matern Fetal Investigat.* 1996; 6: 27-30.
- Heppelmann M, Weinert M, Brömmeling A, Piechotta M, Hoedemaker M, Bollwein H. The effect of puerperal uterine disease on uterine involution in cows assessed by Doppler sonography of the uterine arteries. *Anim Reprod Sci.* 2013; 143: 1-7.
- Kirkinen P, Dudenhausen J, Baumann H, Huch A, Huch R. Postpartum blood flow velocity waveforms of the uterine arteries. *J Reprod Med.* 1988; 33:745-48.
- Köster K, Poulsen Nautrup C, Günzel-Apel AR. A Doppler ultrasonographic study of cyclic changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch. *Reproduction.* 2001; 122: 453-461.
- Krueger L, Koerte J, Tsousis G, Herzog K, Flachowsky G, Bollwein H. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during the first 12 weeks after parturition in healthy dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2009; 114: 23-31.
- Mortensen C, Kelley D, Warren L. Supplemental l-Arginine Shortens Gestation Length and Increases Mare Uterine Blood Flow before and after Parturition. *J Equine Vet Sci.* 2011; 31: 514-520.
- Mulic-Lutvica A, Bakos O, Bekuretzion M, Axelsson O. Ultrasonic evaluation of the uterus and uterine cavity after normal, vaginal delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001; 18: 491-498.
- Mulic-Lutvica A, Eurenus K, Axelsson O. Longitudinal study of Doppler flow resistance indices of the uterine arteries after normal vaginal delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007; 86: 1207-1214.
- Mulic-Lutvica A, Eurenus K, Axelsson O. Uterine artery Doppler ultrasound in postpartum women with retained placental tissue. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2009; 88: 724-728.

- Nakai Y, Imanaka M, Nishio J, Maeda T, Ozaki A, Sun, TT, Ogita S. Uterine blood flow velocity waveforms during early postpartum course following caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1997; 74: 121–124.
- Nautrup CP. Doppler ultrasonography of canine maternal and fetal arteries during normal gestation. *J Reprod Fertil.* 1998; 112: 301–314.
- Orfanou DC, Ververidis HN, Pourlis A, Fragkou IA, Kokoli AN, Boscoc CM, Taitzoglou IA, Tzora A, Nerou CM, Athanasiou L, Fthenakis GC. Post-Partum Involution of the Canine Uterus – Gross Anatomical and Histological Features. *Reprod Dom Anim.* 2009; 44: 152–155.
- Orfanou DC, Ververidis HN, Pourlis A, Fragkou IA, Kokoli AN, Boscoc CM, Taitzoglou IA, Tzora A, Nerou CM, Athanasiou L, Fthenakis GC. Experimental Study of the Post-partum Involuting Genital Tract of the Bitch. Part I: Clinical, Bacteriological and Cytological Features. En: *Proceedings of the 6th International Symposium of Canine and Feline Reproduction, 2008*, pp. 175–176.
- Pharr JW, Post K. Ultrasonography and radiography of the canine postpartum uterus. *Vet Radiol Ultrasound.* 1992; 33: 35-40.
- Tekay A, Jouppila P. A longitudinal Doppler ultrasonographic assessment of the alterations in peripheral vascular resistance of uterine arteries and ultrasonographic findings of the involuting uterus during the puerperium. *Am J Obstet Gynecol.* 1993; 168: 190–198.
- van der Heijden OW, Essers YP, Fazzi G, Peeters LL, Mey JG, van Eys GJ. Uterine artery remodeling and reproductive performance are impaired in endothelial nitric oxide synthase deficient mice. *Biol Reprod.* 2005; 72: 1161-1168.
- van der Heijden OW, Essers YP, Wijnands E, Mey JG, Peeters LL, van Eys GJ. Postpartum reversal of the pregnancy-induced uterine artery remodeling in young, aging, and

eNOS-deficient mice. *Reprod Sci.* 2009; 16: 642-649.

Yeager AE, Concannon PW. Serial ultrasonographic appearance of postpartum uterine involution in beagle dogs. *Theriogenology.* 1990; 34: 523-525.

## CAPÍTULO III

### **Evaluación ecocardiográfica y electrocardiográfica durante el puerperio canino normal**

#### **Introducción**

Durante de la gestación canina, se produce un proceso de adaptación cardíaca materna, que juega un rol indispensable en el aporte sanguíneo uterino (Blanco y col., 2011). A lo largo de la preñez se observa un incremento en la precarga y una disminución en la poscarga, sumado a una hipertrofia de las paredes ventriculares y un aumento progresivo de la función sistólica y del gasto cardíaco (Blanco y col., 2011; Abbott 2010).

Acompañando los cambios adaptativos estructurales y funcionales cardíacos que se producen en la gestación, el corazón sufre además una remodelación electrofisiológica, observándose una disminución de la amplitud de la onda P, un incremento en el voltaje y duración del complejo QRS y un aumento en la duración de la repolarización ventricular (Blanco y col., 2012b).

La falta de adaptación por parte de las estructuras, función y electrofisiología cardíacas maternas puede derivar en una merma en la perfusión uterina, desencadenando un desenlace gestacional adverso. Sumado a esto, se ha observado que la falla en estos cambios adaptativos predice alteraciones obstétricas debido a que puede manifestarse antes que otras anomalías clínicas o ultrasonográficas (Blanco y col., 2012a; Blanco y col., 2012b).

La progresión de muchos de estos cambios adaptativos luego del parto ha sido estudiada en diversas especies, entre ellas, la especie humana (Robson y col., 1987; Zatuchni, 1951),

bovina (Zafiri y col. 2012; Neubert y Schäfer, 1977), caprina (Olsson y col., 2001) y algunas especies murinas (Wong y col., 2002; Poole y col., 2014). Según dichos reportes, el puerperio se caracteriza por una regresión de la mayoría de los cambios estructurales, funcionales y electrofisiológicos cardíacos gestacionales. Asimismo se ha descrito que la lactancia juega un rol determinante en la regresión de dichos parámetros (Sibolboro Mezzacappa, 2001). En caninos, se han descrito las modificaciones en la frecuencia cardíaca (FC) durante el puerperio y la lactancia (Olsson y col., 2003a) y se han reportado las características ecocardiográficas maternas luego del destete (Abbott, 2010). Sin embargo, no hay reportes acerca de la progresión de los cambios ecocardiográficos y electrocardiográficos durante el puerperio. Sabiendo que a lo largo de la gestación se producen cambios estructurales, funcionales y eléctricos en el corazón, resulta de gran interés conocer el comportamiento de los mismos luego del parto y la lactancia, para determinar si dichos cambios son permanentes o se revierten. Por lo expuesto, el objetivo de este capítulo fue analizar los cambios estructurales, funcionales y electrofisiológicos cardíacos mediante ecocardiografía bidimensional y Doppler y electrocardiografía durante el puerperio canino normal.

## **Materiales y métodos**

### *Animales y seguimiento*

Se incluyeron en este estudio veinte perras gestantes de raza pura (11 Poodle Toy, 5 Yorkshire Terrier, 2 Malteses y 2 Bichón Frisé), clínicamente sanas de  $3,85 \pm 0,16$  (1-5) años de edad y un peso de  $3,8 \pm 0,24$  (2-6) kg. La gestación se confirmó mediante una evaluación

ultrasonográfica bidimensional en todos los casos (Día -3; England y col., 2003). Cada una de las hembras fue evaluada los días -3, 3, 10, 17, 24, 38, 52 y 80 luego del parto (considerado como día 0). Todas las perras parieron cachorros sanos a término, los cuales fueron destetados al día 60 posparto.

### *Evaluación ecocardiográfica*

Las evaluaciones ecocardiográficas bidimensionales y mediante ultrasonografía Doppler se realizaron con los animales en estación, usando un transductor sectorial de 7 a 10 MHz (Toshiba Nemio XG, Japón; Chetboul y col., 2005). Para la obtención de los cortes ecocardiográficos, se acopló el transductor a la piel del tórax previamente rasurada. Se utilizaron tanto la ventana paraesternal derecha como la izquierda (Thomas y col, 1993). No se requirió sedación previa en ningún caso.

A partir de un eje corto del ventrículo izquierdo (VI) a nivel de los músculos papilares, y mediante el modo M, se registraron las medidas del diámetro diastólico (DDVI; mm) y sistólico (DSVI; mm) del VI, espesores diastólico (TIVD; mm) y sistólico (TIVS; mm) del tabique interventricular y espesores diastólico (PLD; mm) y sistólico (PLS; mm) de la pared libre del VI.

Para evaluar la función sistólica se calculó la fracción de acortamiento (FA; %) como  $(DDVI - DSVI) / DDVI \times 100$ . La velocidad media de acortamiento circunferencial (VMAC; circ/s), el estrés de fin de sístole (EFS; dinas/s) y la relación radio espesor (RRE) se calcularon según las fórmulas correspondientes (Kienle, 1998; Boon, 1998; Vuille & Weyman, 1994). Desde el eje largo de la ventana paraesternal derecha se midió el diámetro atrial izquierdo (AI; mm),

desde anterior a posterior, a lo largo de una línea paralela al anillo mitral, que divide al atrio en dos mitades iguales (Boon, 1998; Rishniw y Erb, 2000).

Desde la ventana paraesternal izquierda se obtuvo una vista apical de cinco cámaras. Se alineó el cursor paralelo al flujo aórtico y se posicionó la ventana Doppler distal a la válvula aórtica. A partir de la medición de la integral de velocidad y tiempo del flujo aórtico (VTI) mediante Doppler espectral, se calculó el volumen sistólico (VS; mL) como el producto de la VTI y el área aórtica (Boon, 1998). El gasto cardíaco (GC; L/min) se calculó como el producto de VS y la FC (lpm), obtenida a partir de la evaluación electrocardiográfica.

Se evaluó la función diastólica utilizando Doppler espectral a nivel de la válvula mitral, desde un eje apical de cuatro cámaras. Se midieron los picos de velocidad de las ondas mitrales E (E; m/s) y A (A; m/s), y se evaluaron el tiempo de desaceleración de la onda E (Td; ms) y la relación E/A (E/A).

Para minimizar la variabilidad, se realizaron tres mediciones consecutivas de cada parámetro, las cuales fueron hechas por un único operador entrenado (PRB), siguiendo las guías de recomendaciones específicas (Thomas y col., 1993; Gottdiener y col., 2004; Nagueh y col., 2009).

#### *Presión arterial sistémica*

La presión arterial sistémica (PAS; mm Hg) se midió utilizando un equipo Doppler vascular durante la sístole (DV610 Medmega, Brasil). El ancho del mango fue del 40% de la circunferencia del antebrazo (Brown y col, 2007). Se colocó a las perras en decúbito lateral y se tomaron 3 mediciones en el mismo miembro.

### *Evaluación electrocardiográfica*

Para el registro de los electrocardiogramas (ECG), se posicionó a las pacientes en decúbito lateral derecho sobre una superficie aislante. Las hembras fueron sostenidas manualmente con los miembros perpendiculares al cuerpo y ligeramente separados (Ferasin y col., 2010). Los electrodos se acoplaron a la piel con clips metálicos de tipo cocodrilo y se los humedeció con alcohol para mejorar la transmisión eléctrica.

Luego se procedió a realizar los ECG en un papel calibrado, según reportes previos (Tilley, 1992a; Kittleson, 1998). Se registraron las derivaciones I, II, III, aVR, aVL, aVF, CV6LU, CV6LL, CV5RL y V10 a una velocidad de papel de 50 mm/s. Luego, la derivación II fue nuevamente registrada a una velocidad de 25 mm/s para el análisis de la FC (lpm) y ritmo cardíaco (RC; ritmo sinusal regular o arritmia sinusal).

Luego de la realización del registro, los ECG fueron analizados por un único operador entrenado (PRB). Se midieron manualmente a una velocidad de papel de 50 mm/s el eje eléctrico medio (EEM; grados), la duración (Pd; ms) y amplitud (Pa; mV) de la onda P, el intervalo P-R (PR; ms), la duración (QRSd; ms) y amplitud (QRSa; mV) del complejo QRS, el intervalo Q-T (QT; ms) y el segmento ST (ST; mV; Tilley, 1992a). Se midieron y promediaron 3 latidos consecutivos en los ritmos sinusales y 6 en las hembras con arritmia sinusal (Blanco y col., 2012b). Se midió además el intervalo R-R (RR; ms) entre dos complejos consecutivos, con el cual se corrigió el intervalo QT (QTc) utilizando la fórmula de Van de Water ( $QTc = QT - 0,087(RR - 1000)$ ; Tattersall y col., 2006).

### *Análisis estadístico*



Se verificó la normalidad de los datos mediante el test de Kolmogorov - Smirnov. Se analizaron el DDVI, DSVI, TIVD, TIVS, PLD, PLS, FA, VMAC, EFS, RRE, AI, VS, GC, E, A, Td, E/A, PAS, FC, EEM, Pd, Pa, PR, QRSd, QRSa, QT, ST, y QTc mediante un ANOVA de medidas repetidas seguido por un test de Tukey. El RC se analizó mediante un test de Chi cuadrado (SPSS 17.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Se consideró como significativo un valor de  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

### *Evaluación ecocardiográfica y de la presión arterial sistémica*

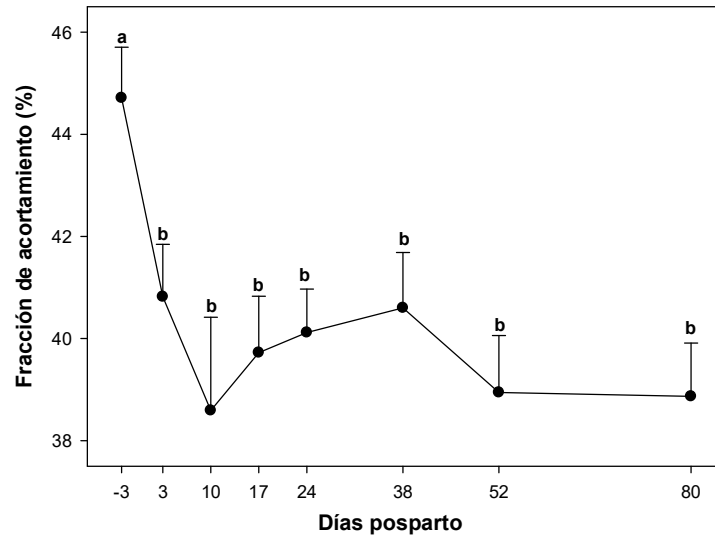
Durante la primera semana posparto se observó una marcada disminución de la FA ( $p < 0,01$ ; Fig. 1), TIVs ( $p < 0,05$ ) y AI ( $p < 0,01$ ; Tabla 1). Inversamente, para el mismo momento, el DSVI ( $p < 0,01$ ; Tabla 1) y el EFS ( $p < 0,01$ ; Fig. 2) mostraron un pronunciado incremento. Durante el período de estudio, la VMAC ( $p < 0,01$ ; Tabla 1), VS ( $p < 0,01$ ; Fig. 3), GC ( $p < 0,01$ ; Fig. 4), E ( $p < 0,05$ ) y A ( $p < 0,05$ ; Fig. 5) disminuyeron progresivamente.

La PAS aumentó de manera marcada durante la primera semana posparto, presentando luego un incremento lento hacia el final del estudio ( $p < 0,01$ ; Fig. 6). El DDVI, TIVD, PLD, PLS, RRE, Td y A/E se mantuvieron sin cambios durante el puerperio ( $p > 0,05$ ; Tabla 1).

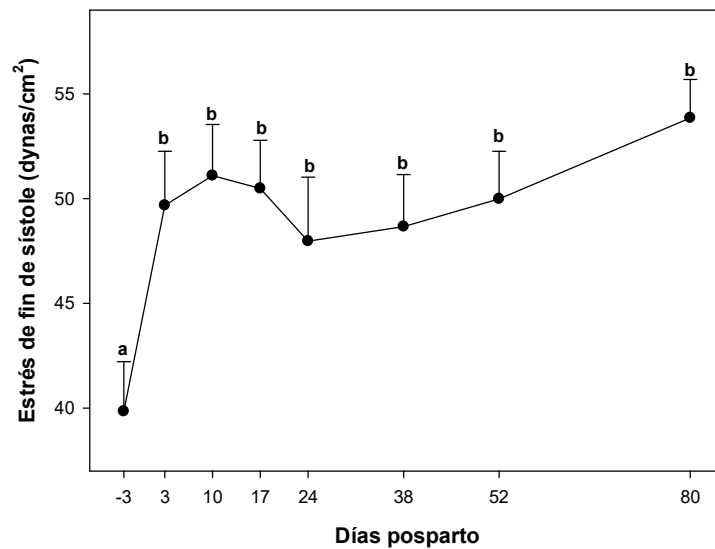
**Tabla 1:** Parámetros ecocardiográficos (media±EEM) de 20 hembras caninas evaluadas desde el día -3 al día 80 del puerperio normal. Las letras en superíndice indican diferencias ( $p<0,05$ ) entre los días de observación.

	Días posparto							
	-3	3	10	17	24	32	58	80
TIVD	5,5±0,1	5,6±0,2	5,5±0,1	5,5±0,1	5,50±0,1	5,5±0,1	5,3±0,1	5,4±0,1
DDVI	21,5 ±0,4	21,9 ±0,4	22,3 ±0,5	22,1 ±0,5	21,9 ±0,5	22,1 ±0,5	21,5 ±0,5	21,8 ±0,5
PLD	4,4±0,1	4,2±0,1	4,3±0,1	4,3±0,1	4,4±0,1	4,5±0,1	4,6±0,1	4,4±0,1
TIVS	9,4 ±0,2 <sup>a</sup>	8,6 ±0,2 <sup>b</sup>	8,9 ±0,2 <sup>a,b</sup>	8,8 ±0,2 <sup>a,b</sup>	8,7 ±0,2 <sup>b</sup>	9,0 ±0,3 <sup>a,b</sup>	8,8 ±0,2 <sup>a,b</sup>	8,7 ±0,1 <sup>a,b</sup>
DSVI	12,0 ±0,4 <sup>a</sup>	13,0 ±0,4 <sup>b</sup>	13,6± 0,4 <sup>b</sup>	13,3 ±0,4 <sup>b</sup>	13,1 ±0,4 <sup>b</sup>	13,1 ±0,4 <sup>b</sup>	13,1 ±0,4 <sup>b</sup>	13,4 ±0,4 <sup>b</sup>
PLS	6,7±0,2	6,8±0,1	6,6±0,2	6,7±0,2	6,5±0,1	6,8±0,2	6,9±0,2	6,8±0,2
AI	22,1 ±0,5 <sup>a</sup>	20,5 ±0,5 <sup>b</sup>	20,9 ±0,4 <sup>a,b</sup>	20,8 ±0,4 <sup>a,b</sup>	20,9 ±0,4 <sup>a,b</sup>	20,9 ±0,3 <sup>a,b</sup>	20,9 ±0,4 <sup>a,b</sup>	20,2 ±0,5 <sup>b</sup>
VMAC	3,1 ±0,1 <sup>a</sup>	3,0 ±0,1 <sup>a,b</sup>	2,6 ±0,1 <sup>b</sup>	2,8 ±0,1 <sup>a,b</sup>	2,7 ±0,1 <sup>b</sup>	2,8 ±0,1 <sup>a,b</sup>	2,7 ±0,1 <sup>b</sup>	2,7 ±0,1 <sup>a,b</sup>
RRE	0,4±0,01	0,4±0,01	0,4±0,01	0,4±0,01	0,4±0,01	0,4±0,01	0,4±0,01	0,4±0,01

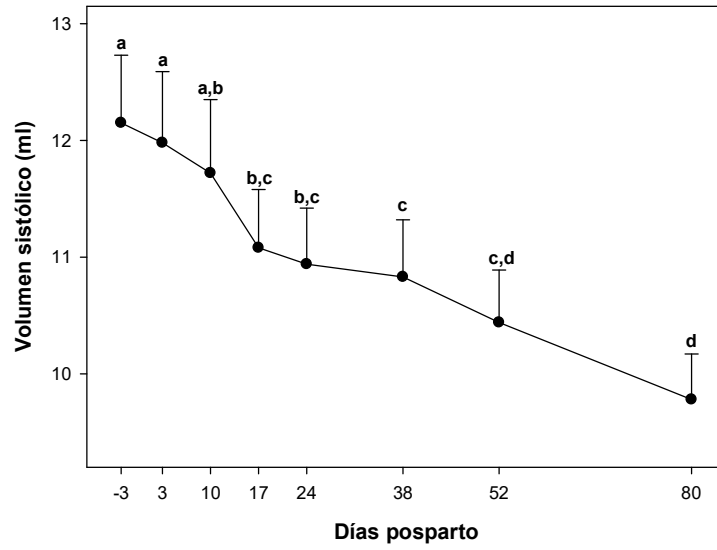
Tabique interventricular en diástole (TIVD; mm), diámetro diastólico del ventrículo izquierdo (DDVI; mm), pared libre del ventrículo izquierdo en diástole (PLD; mm), tabique interventricular en sístole (TIVS; mm), diámetro sistólico del ventrículo izquierdo (DSVI; mm), pared libre del ventrículo izquierdo en sístole (PLS; mm), diámetro del atrio izquierdo (AI; mm), velocidad media de acortamiento circunferencial (VMAC; dinas/s) y relación radio espesor (RRE).



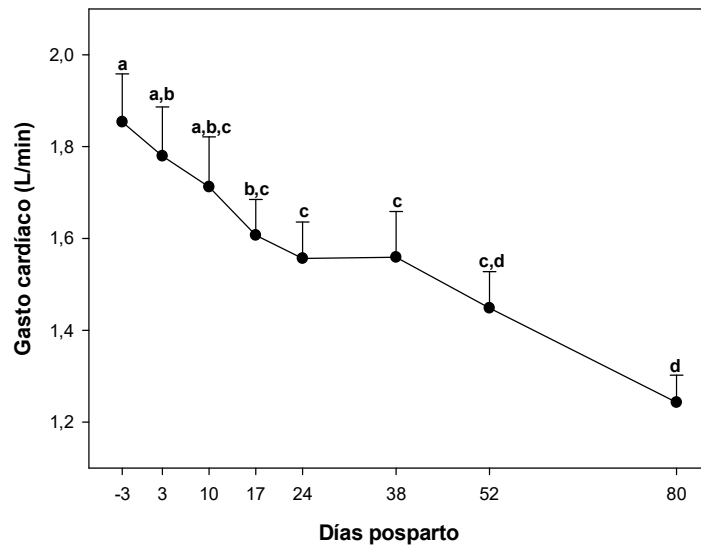
**Figura 1:** Fracción de acortamiento (media±EEM) de 20 hembras caninas evaluadas desde el día -3 al día 80 del puerperio normal. Las letras indican diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los días de observación.



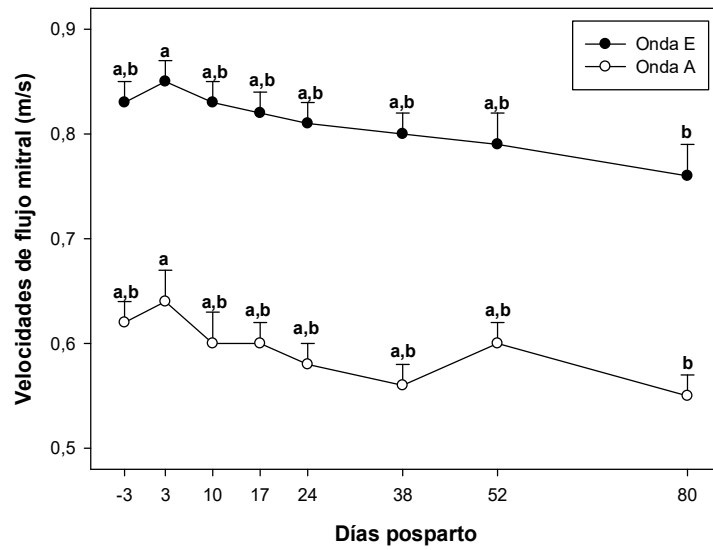
**Figura 2:** Estrés de fin de sístole (media±EEM) de las mismas hembras caninas de la Figura 1. Las letras en indican diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los días de observación.



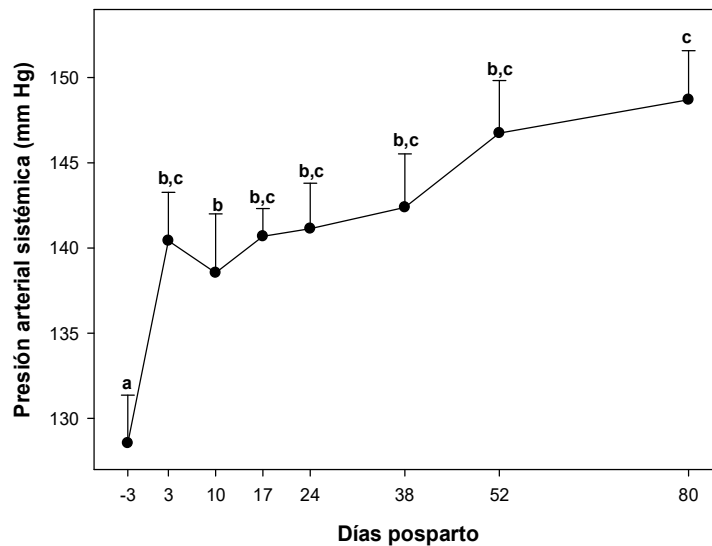
**Figura 3:** Volumen sistólico (media±EEM) de las mismas hembras caninas de la Figura 1. Las letras en superíndice indican diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los días de observación.



**Figura 4:** Gasto cardíaco (media±EEM) de las mismas hembras caninas de la Figura 1. Las letras en superíndice indican diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los días de observación.



**Figura 5:** Ondas de flujo mitral E y A (media±EEM) de las mismas hembras caninas de la Figura 1. Las letras en superíndice indican diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los días de observación.



**Figura 6:** Presión arterial sistémica (media±EEM) de las mismas hembras caninas de la Figura 1. Las letras indican diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los días de observación.

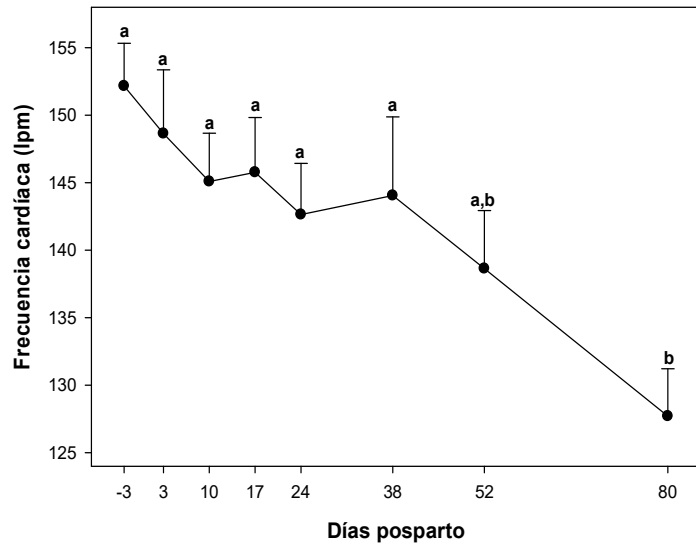
### *Evaluaciones electrocardiográficas*

Durante el período de estudio, la FC ( $p<0,01$ ; Fig. 7) y el QTc ( $p<0,01$ ) disminuyeron progresivamente, mientras que se observó un incremento de Pa ( $p<0,01$ ; Tabla 2). La QRSa disminuyó en la segunda semana luego del parto, para luego aumentar durante las semanas siguientes ( $p<0,01$ ; Fig. 8). Se observó una disminución del desvío izquierdo del EEM durante este período ( $p<0,01$ ; Tabla 2). En la observación preparto, la mayoría de las hembras presentaron ritmo sinusal regular, en contraste con el Día 3, cuando la mayoría de las perras mostraron arritmia sinusal ( $p<0,01$ ). Desde el día 10 y hasta el final del estudio todas las perras presentaron arritmia sinusal. La Pd, PR, QRSd, QT y ST se mantuvieron invariables durante el período de estudio.

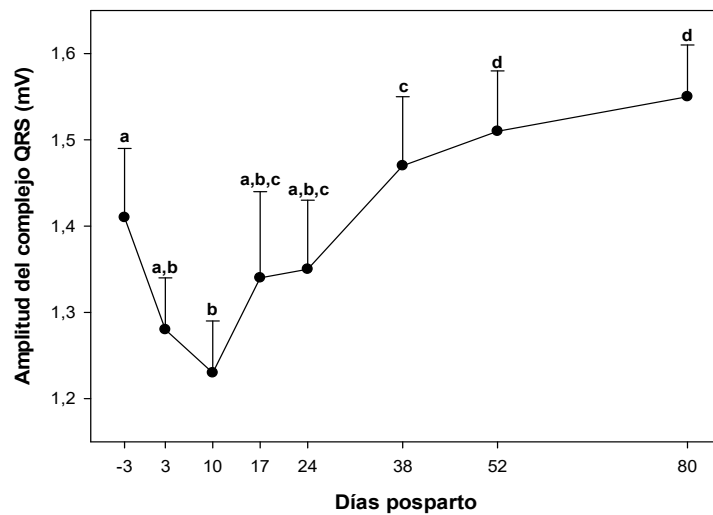
**Tabla 2:** Parámetros electrocardiográficos (media $\pm$ EEM) de las mismas hembras caninas de la Tabla 1. Las letras indican diferencias ( $p<0,05$ ) entre los días de observación.

	Días posparto							
	-3	3	10	17	24	58	32	80
EEM	38,6 $\pm 3,1^a$	48,7 $\pm 3,2^{a,b}$	48,2 $\pm 2,3^b$	51,7 $\pm 3,8^b$	51,2 $\pm 3,3^b$	53,1 $\pm 3,3^b$	52,2 $\pm 3,3^b$	58,3 $\pm 3,4^b$
Pd	34 $\pm$ 1	34 $\pm$ 1	34 $\pm$ 1	34 $\pm$ 1	33 $\pm$ 1	34 $\pm$ 1	32 $\pm$ 1	34 $\pm$ 1
Pa	0,21 $\pm 0,01^{a,b}$	0,21 $\pm 0,01^a$	0,22 $\pm 0,01^a$	0,23 $\pm 0,01^{a,b,c}$	0,23 $\pm 0,01^{a,b,c}$	0,26 $\pm 0,01^{b,c,d}$	0,29 $\pm 0,01^d$	0,27 $\pm 0,01^{c,d}$
PR	88 $\pm$ 3	90 $\pm$ 3	89 $\pm$ 3	88 $\pm$ 3	89 $\pm$ 3	89 $\pm$ 3	87 $\pm$ 4	87 $\pm$ 3
QRSd	47 $\pm$ 1	45 $\pm$ 1	45 $\pm$ 1	45 $\pm$ 1	45 $\pm$ 1	45 $\pm$ 1	45 $\pm$ 1	46 $\pm$ 1
ST	-0,10 $\pm 0,01$	-0,10 $\pm 0,01$	-0,09 $\pm 0,01$	-0,10 $\pm 0,01$	-0,10 $\pm 0,01$	-0,10 $\pm 0,007$	-0,10 $\pm 0,01$	-0,11 $\pm 0,01$
QT	178 $\pm$ 1	178 $\pm$ 2	174 $\pm$ 2	172 $\pm$ 1	173 $\pm$ 2	173 $\pm$ 1	172 $\pm$ 1	176 $\pm$ 2
QTc	231 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	228 $\pm$ 1 <sup>a,b</sup>	225 $\pm$ 2 <sup>a,b,c</sup>	223 $\pm$ 1 <sup>b,c</sup>	222 $\pm$ 2 <sup>b,c</sup>	224 $\pm$ 1 <sup>b,c</sup>	220 $\pm$ 2 <sup>c</sup>	221 $\pm$ 1 <sup>c</sup>

Eje eléctrico medio (EEM; grados), duración (Pd; ms) y amplitud (Pa; mV) de la onda P, intervalo P-R (PR; ms), duración (QRSd; ms) y amplitud (QRSa; mV) del complejo QRS, segmento S-T (ST; mV), intervalo Q-T (QT; ms) e intervalo Q-T corregido (QTc; ms).



**Figura 7:** Frecuencia cardíaca (media±EEM) de las mismas hembras caninas de la Figura 1. Las letras indican diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los días de observación.



**Figura 8:** Amplitud del complejo QRS (media±EEM) de las mismas hembras caninas de la Figura 1. Las letras indican diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los días de observación.

## Discusión

Si bien existen numerosos reportes acerca de los cambios cardiovasculares en diversas condiciones reproductivas en caninos, hasta donde sabemos, este es el primer estudio acerca de los cambios progresivos ecocardiográficos y electrocardiográficos durante el puerperio canino normal.

En el presente estudio, se observó una disminución de la función sistólica y contractilidad miocárdica para la primera semana luego del parto. Estos hallazgos coinciden con reportes previos en humanos (Robson y col., 1987; Pandey y col., 2010) y bovinos (Zafiri y col., 2012). La caída abrupta de la precarga debida al menor requerimiento de sangre luego del parto puede ser una de las principales causas de este hallazgo (Batista y col., 2013). Sumado a esto, la oxitocina liberada durante el parto y la lactancia (Olsson y col 2003b) podría tener un efecto inotrópico negativo, debido a que interactúa con los receptores oxitocínicos de las fibras parasimpáticas postganglionares, estimulando la liberación de acetilcolina. Esta hormona actúa con los receptores muscarínicos generando una menor fuerza de contracción (Mukaddam-Daher y col., 2001; Gutkowska y col., 2014). Dentro de los parámetros que permiten evaluar la función sistólica, la FA presentó un comportamiento similar al de la mujer y la vaca (Robson y col., 1987; Zafiri y col., 2012). Sin embargo, en estas especies, la variación de la FA se asocia a una disminución en el DDVI, el cual permaneció invariable en estas perras. En el presente estudio, la caída posparto de la FA pareció deberse al incremento en el DSVI. Este hallazgo coincide con un reporte previo en caninos, donde la FA post destete fue menor a la preparto y esa disminución se asoció a un incremento del DSVI (Abbott, 2010).



De la misma manera, el descenso abrupto de los requerimientos uterinos de sangre y, por ende, de la precarga materna puede explicar la caída en el VS, GC, E y A y el aumento en la PAS a lo largo del estudio, tal como se describió en la mujer y la vaca (Robson y col., 1987; Zafiri y col., 2012). Sumando a esto, el enlentecimiento de la involución luego de la primera semana se debería al aumento de la demanda metabólica y de la perfusión mamaria producto de la lactancia (Sibolboro Mezzacappa y col., 2001; Olsson y col., 2003a).

La falta de disminución en algunos de los espesores parietales del VI puede corresponder a una demora en la regresión de la hipertrofia gestacional (Blanco y col., 2011). Al respecto, los reportes en medicina humana son contradictorios. Schannwell y col. (2002) reportaron que los cambios adaptativos cardíacos gestacionales regresan hacia la octava semana posparto, mientras que Robson y col. (1987) encontraron que la reversión de esa hipertrofia no ocurre dentro de las primeras 24 semanas posteriores al parto. Los hallazgos del presente capítulo están en línea con este último estudio. Asimismo, se ha reportado que en la mujer los embarazos subsecuentes pueden producir la intensificación de algunos de los cambios adaptativos cardiovasculares, como un mayor aumento en las dimensiones ventriculares y en el gasto cardíaco (Clapp y Capeless, 1997). Se necesitan más estudios en gestaciones caninas sucesivas para comprobar si en la perra ocurre un fenómeno similar.

La FC disminuyó progresivamente a lo largo del puerperio, mostrando cambios significativos en las últimas observaciones. Este hallazgo coincide con lo descrito por Olsson (2003a) para la especie canina. La alta FC observada al final de la gestación asegura un elevado gasto cardíaco que optimiza el aporte de oxígeno y nutrientes al útero grávido (Wong y col., 2002; Blanco y col., 2012b). Durante las primeras semanas posteriores al parto, la demanda energética de la lactancia está en su pico máximo (Scantlebury y col., 2000). Esto explicaría los altos valores de FC durante este período, que descienden luego del destete.

Sumado a los cambios en la FC, la arritmia sinusal de origen respiratorio estuvo ausente al final de la gestación en todas estas perras, sugiriendo una disminución del tono vagal durante este período (Baumert y col., 2010). Este hallazgo está en línea con lo descrito para la gestación y el parto canino por Lucio y col. (2009) y Blanco y col. (2012b). El incremento en el tono vagal, como posible consecuencia de la activación de los receptores colinérgicos antes mencionada, produce la desaceleración de la FC, lo que explica la aparición de la arritmia sinusal a lo largo de las semanas posparto (Mukaddam-Daher y col., 2001; Tilley, 1992b). Los cambios en el voltaje de la onda P y del complejo QRS encontrados en este estudio son similares a los reportados previamente en bovinos (Neubert y Schäfer, 1977; Schäfer y Neubert, 1977). El comportamiento de estas variables puede ser explicado a partir del efecto aditivo de varios cambios que pueden influenciar la electrofisiología cardíaca en el período posparto. A lo largo de la gestación canina normal, se observa un descenso de Pa por una disminución de los canales de potasio miocárdicos (Eghbali y col., 2005; Blanco y col., 2011). Dicho fenómeno puede persistir durante los primeros días luego del parto, para luego revertirse, lo que explica el incremento de Pa hacia el final de este estudio (Pacher y col., 1999). Con respecto a QRSa, el descenso abrupto del aporte de sangre al útero luego del parto produce una disminución del retorno venoso, que puede traducirse electrocardiográficamente en una reducción de QRSa (Battler y col., 1979). Asimismo, el efecto de la oxitocina, que deriva en una menor entrada de calcio a los cardiomiocitos, puede influir en la caída inicial de esta variable (Mukaddam-Daher y col., 2001; Eghbali y col., 2005).

De acuerdo con un reporte previo en caninos, el intervalo QT no varía durante la gestación (Blanco y col., 2012b). De la misma manera, no encontramos variaciones de este parámetro a lo largo del período posparto, probablemente como consecuencia de las variaciones de la FC materna. Sin embargo, cuando el intervalo QT fue corregido para la FC, se encontró un

incremento durante la gestación (Blanco y col., 2012b) y una disminución progresiva a lo largo de este estudio. Según se ha descrito en la gestación en ratones, las células miocárdicas desarrollan una disminución en el Ito-f, un constituyente molecular de la salida de potasio extracelular, lo que se asocia a un potencial de acción prolongado y, por ende, a un mayor QTc (Eghbali y col., 2005). La reversión de estos mecanismos luego del parto y la activación de estos canales por parte de la oxitocina pueden explicar la disminución del QTc durante el puerperio (Pacher y col., 1999; Mukaddam-Daher y col., 2001).

La evaluación del sistema cardiovascular en la perra gestante ha sido de mucha utilidad para encontrar predictores de alteraciones obstétricas en caninos (Blanco y col., 2012a; Blanco y col., 2012b). Inclusive, en medicina humana esta evaluación es de uso rutinario en diversos estados reproductivos que predisponen al desarrollo de cardiopatías con impacto clínico (Bhakta y col., 2007, Gongora y Wenger, 2015). Conocer el comportamiento de los cambios adaptativos cardíacos luego del parto brinda herramientas para la comprensión de la fisiología cardíaca durante este período y plantea las bases para el desarrollo de protocolos de seguimiento para la detección precoz de enfermedades. Se necesitan más estudios para determinar la influencia específica de la lactancia, a través de la comparación de hembras lactantes y no lactantes.

Se concluye que en la perra, los cambios adaptativos gestacionales cardíacos regresan a lo largo del puerperio.

## **Referencias**

- Abbott JA. The effect of pregnancy on echocardiographic variables in healthy bitches. *J Vet Cardiol.* 2010; 12: 123-128.
- Batista PR, Gobello C, Corrada Y, Pons E, Arias DO, Blanco PG. Doppler ultrasonographic assessment of uterine arteries during normal canine puerperium. *Anim Reprod Sci.* 2013; 141: 172-176.
- Battler A, Froelicher V, Slutsky R, Ashburn W. Relationship of QRS amplitude changes during exercise to left ventricular function and volumes and the diagnosis of coronary artery disease. *Circulation.* 1979; 5: 1004-1013.
- Baumert M, Seeck A, Faber R, Nalivaiko E, Voss A. Longitudinal changes in QT interval variability and rate adaptation in pregnancies with normal and abnormal uterine perfusion. *Hypertens Res.* 2010; 33: 555-560.
- Bhakta P, Biswas BK, Banerjee B. Peripartum cardiomyopathy: review of the literature. *Yonsei Med J.* 2007; 31: 731–747.
- Blanco PG, Batista PR, Gómez FE, Arias DO, Gobello C. Echocardiographic and Doppler assessment of maternal cardiovascular function in normal and abnormal canine pregnancies. *Theriogenology.* 2012a; 78: 1235-1242.
- Blanco PG, Batista PR, Re NE, Mattioli GA, Arias DO, Gobello C. Electrocardiographic changes in normal and abnormal canine pregnancy. *Reprod Domest Anim.* 2012b; 47:252-256.
- Blanco PG, Tórtora M, Rodríguez R, Arias D, Gobello C. Ultrasonographic assessment of maternal cardiac function and peripheral circulation during normal gestation in dogs. *Vet J.* 2011; 190: 154- 159.
- Boon J. The echocardiographic examination. En: Boon, J.A. (Ed.), *Manual of Veterinary Echocardiography.* Williams and Wilkins, Media, 1998. pp. 35–128.

- Brown S, Atkins C, Bagley R, Carr A, Cowgill L, Davidson M, American College of Veterinary Internal Medicine, y col. Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *J Vet Intern Med.* 2007; 21: 542–558.
- Chetboul V, Tidholm A, Nicolle A, Sampedrano CC, Gouni V, Pouchelon JL, Lefebvre HP, Concordet D. Effects of animal position and number of repeated measurements on selected two-dimensional and M-mode echocardiographic variables in healthy dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2005; 227: 743–747.
- Clapp JF 3ro, Capeless E. Cardiovascular function before, during, and after the first and subsequent pregnancies. *Am J Cardiol.* 1997; 1; 80: 1469-1473.
- Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan H, Wang Y, Toro L, Stefani E. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circulation Research.* 2005; 96: 1208–1216.
- England G, Yeager A, Concannon PW. Ultrasound Imaging of the Reproductive Tract of the Bitch. En: Concannon PW, Verstegen J, England G (eds.) *Recent Advances in Small Animal Reproduction.* Ithaca, NY: IVIS; 2003 (<http://www.ivis.org>), Document A1226.0303.
- Ferasin L, Ferasin H, Little CJ. Lack of correlation between canine heart rate and body size in veterinary clinical practice. *J Small Anim Pract.* 2010; 51: 412-418.
- Gongora MC, Wenger NK. Cardiovascular Complications of Pregnancy. *Int J Mol Sci.* 2015; 16:23905-23928.
- Gottdiener JS, Bednarz J, Devereux R, Gardin J, Klein A, Manning WJ, y col. American Society of Echocardiography recommendations for use of echocardiography in clinical trials. *J Am Soc Echocardiogr.* 2004; 17: 1086–1119.

- Gutkowska J, Jankowski M, Antunes-Rodrigues J. The role of oxytocin in cardiovascular regulation. *Braz J Med Biol Res.* 2014; 47: 206-214.
- Kienle RD. Echocardiography. En: Kittelson MD, Kienle RD (Eds.), *Small animal Cardiovascular Medicine Textbook.* Mosby, St. Louis, 1998, pp. 95–117.
- Kittelson MD. Electrocardiography. En: Kittelson MD, Kienle RD (eds.), *Small animal cardiovascular medicine textbook.* Mosby, St. Louis, 1998, pp. 72-94.
- Lúcio CF, Silva LC, Rodrigues JA, Veiga GA, Vannucchi CI. Peripartum haemodynamic status of bitches with normal birth or dystocia. *Reprod Domest Anim.* 2009; 44: 133-136.
- Mukaddam-Daher S, Yin YL, Roy J, Gutkowska J, Cardinal R. Negative inotropic and chronotropic effects of oxytocin. *Hypertension.* 2001; 38: 292-296.
- Nagueh SF, Appleton CP, Gillebert TC, Marino PN, Oh JK, Smiseth OA, y col. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2009; 22: 107–133.
- Neubert C, Schäfer M. Untersuchungen zum EKG frischlaktierender Kühe, 1 Mitteilung: Das EKG in den ersten Wochen der Laktation und bei Eiweibüberangebot in der Ration. *Arch Exper Vet Med.* 1977; 31: 575-580.
- Olsson K, Hansson A, Hydbring E, von Walter LW, Häggstrom J. A serial study of heart function during pregnancy, lactation and the dry period in dairy goats using echocardiography. *Exp Physiol.* 2001; 86: 93-99.
- Olsson K, Bergström A, Kindahl H, Lagerstedt AS. Increased plasma concentrations of vasopressin, oxytocin, cortisol and the prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  metabolite during labour in the dog. *Acta Physiol Scand.* 2003b; 179: 281–287.

- Olsson K, Lagerstedt AS, Bergström A, Häggström J. Change of diurnal heart rate patterns during pregnancy and lactation in dogs (*Canis familiaris*). *Acta Vet Scand.* 2003a; 44: 105-110.
- Pacher P, Ungvári Z, Nánási PP, Mucha I, Kecskeméti V, Losonczy G. Post-partum prolongation of the atrial repolarization in rabbit. *Acta Physiol Scand.* 1999; 166:1-5.
- Pandey AK, Banerjee AK, Das A, Bhawani G, Kumar A, Majumadar B, Bhattacharya AK. Evaluation of maternal myocardial performance during normal pregnancy and *postpartum*. *Indian Heart J.* 2010; 62: 64-67.
- Poole AT, Vincent KL, Olson GL, Patrikeev I, Saade GR, Stuebe A, Bytautiene E. Effect of lactation on maternal *postpartum* cardiac function and adiposity: a murine model. *Am J Obstet Gynecol.* 2014; 211:424.e1-7.
- Rishniw M, Erb HN. Evaluation of four 2-dimensional echocardiographic methods of assessing left atrial size in dogs. *J Vet Intern Med.* 2000; 14: 429-435.
- Robson SC, Hunter S, Moore M, Dunlop W. Haemodynamic changes during the *puerperium*: a Doppler and M-mode echocardiographic study. *Br J Obstet Gynaecol.* 1987; 94: 1028-1039.
- Scantlebury M, Butterwick R, Speakman JR. Energetics of lactation in domestic dog (*Canis familiaris*) breeds of two sizes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2000; 125: 197-210.
- Schäfer M, Neubert C. Untersuchungen zum EKG frischlaktierender Kühe, 2 Mitteilung: Das EKG im Vergleich zum Verhalten einiger Parameter des Mineralstoff- und Kohlenhydrat-Fettstoffwechsels. *Arch Exper Vet Med.* 1977; 31: 581-589.

- Schannwell CM, Zimmermann T, Schneppenheim M, Plehn G, Marx R, Strauer BE. Left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in healthy pregnant women. *Cardiology*. 2002; 97: 73-78.
- Sibolboro Mezzacappa E, Kelsey RM, Myers MM, Katkin ES. Breast-feeding and maternal cardiovascular function. *Psychophysiology*. 2001; 38: 988-997.
- Tattersall ML, Dymond M, Hammond T, Valentin JP. Correction of QT values to allow for increases in heart rate in conscious Beagle dogs in toxicology assessment. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2006; 53: 11-19.
- Thomas WP, Gaber CE, Jacobs GJ, Kaplan PM, Lombard CW, Moise NS, y col. Recommendations for standards in transthoracic two-dimensional echocardiography in the dog and cat: Echocardiography Committee of the Specialty of cardiology, American College of Veterinary Internal Medicine. *J Vet Intern Med*. 1993; 7: 247–252.
- Tilley LP. Analysis of common canine cardiac arrhythmias. En: Tilley, LP (ed.), *Essentials of canine and feline electrocardiography*. Pennsylvania, Estados Unidos, Lippincott Williams & Wilkins, Media, 1992b, pp. 127-207.
- Tilley LP. The approach to the electrocardiogram. En: Tilley, LP (ed.), *Essentials of canine and feline electrocardiography*. Pennsylvania, Estados Unidos, Lippincott Williams & Wilkins, Media, 1992a, pp. 40-50.
- Vuille C, Weyman AE. Left ventricle I: general considerations, assessment of chamber size and function. En: Weyman, A.E. (Ed.), *Principles and Practice of Echocardiography*. Estados Unidos, Williams and Wilkins, 1994, pp. 575–624.
- Wong AY, Kulandavelu S, Whiteley KJ, Qu D, Langille BL, Adamson SL. Maternal cardiovascular changes during pregnancy and *postpartum* in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282: 918-925.



Zarifi M, Buczinski S, Rezakhani A, Mokhber Dezfouli MR, Khonsha A. Effect of lactation on functional and morphological echocardiographic variables in adult dairy cows. *J Vet Cardiol.* 2012; 14: 415-421.

Zatuchni J. The electrocardiogram in pregnancy and *puerperium*. *Am Heart J.* 1951; 42: 11–17.

## CAPÍTULO IV

### **Evaluación del flujo sanguíneo uterino en hembras caninas con hiperplasia endometrial quística (HEQ) y complejo HEQ-piómetra**

#### **Introducción**

El complejo Hiperplasia endometrial quística- piómetra (HEQ-P) es una de las enfermedades uterinas más prevalentes en hembras caninas (Pretzer, 2008). Es una entidad característica del diestro, en la que usualmente se ven afectadas hembras de edad media a avanzada (Pretzer, 2008). La hiperplasia endometrial quística (HEQ) es una enfermedad subclínica caracterizada por la proliferación de las glándulas endometriales, lo que resulta en la formación de estructuras quísticas, pudiendo, en algunos casos, estar asociada a la presencia de contenido intraluminal (Dow, 1958; Schlafer y Gifford, 2008).

En la piómetra, el contenido uterino es de tipo purulento y se relaciona con la presencia de signología clínica severa asociada a la infección sistémica secundaria a la contaminación bacteriana (Hagman, 2012). En cambio, cuando el contenido es seroso, sanguinolento o mucoso la condición, generalmente, no se asocia a otro signo más que infertilidad (Pretzer, 2008; Schlafer, 2012; Wilborn y Maxwell, 2012). Dichos contenidos pueden progresar a piómetra luego de que se produzca la colonización bacteriana (Pretzer, 2008).

En caninos, la evaluación ultrasonográfica del útero aporta información valiosa para el diagnóstico de enfermedades uterinas. Este método permite determinar las características de la pared y la presencia de contenido luminal, diferenciando entre gestaciones y condiciones

patológicas (England y col., 2003; Bigliardi y col., 2004; Davidson y Baker, 2009). Aunque se ha sugerido que la ecogenicidad de los contenidos patológicos puede asociarse a la celularidad de los mismos, resulta difícil diferenciar la naturaleza del contenido mediante ultrasonografía (Davidson y Baker, 2009; Nyland y Mattoon, 2002).

La ultrasonografía Doppler ha demostrado ser una herramienta útil para el diagnóstico de numerosas alteraciones reproductivas en muchas especies, a partir de la detección del incremento del flujo sanguíneo uterino producido por algunas condiciones patológicas (Özbay y Deveci, 2011; Emoto y col., 2002; Heppelmann y col., 2013; Debertolis y col., 2015).

En caninos, esta técnica ha sido usada para evaluar las arterias uterinas durante el estro, la gestación (normal y patológica) y el puerperio (Blanco y col., 2011; Freeman y col., 2013; Batista y col., 2013). Aunque la caracterización del flujo sanguíneo uterino mediante ultrasonografía Doppler permitiría contribuir al diagnóstico precoz de la HEQ y piómetra, no se ha estudiado en profundidad la aplicación de esta técnica en perras con enfermedades uterinas. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue describir y comparar el flujo sanguíneo uterino en perras sanas, con HEQ y complejo HEQ-P

## **Materiales y métodos**

### *Animales y grupos experimentales*

Se incorporaron a este estudio 90 hembras caninas en diestro (15 a 60 días luego del estro previo), de  $5,8 \pm 0,4$  (1-14) años de edad y  $16,7 \pm 1,5$  (3-40) kg de peso que fueron atendidas en

el Servicio de Cardiología y Ultrasonografía de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

A cada una de las hembras se les realizó un examen clínico y hematológico, en el que se evaluó la presencia de signos de enfermedad sistémica (fiebre, inapetencia, depresión; Smith 2006) y leucocitosis ( $GB > 17.000$  cel/ml; Mateus y Eilts, 2010). Finalmente sus úteros fueron examinados ultrasonográficamente como se describe más adelante (Mediciones ultrasonográficas), y los animales fueron clasificados en alguno de los siguientes grupos:

- **Grupo piómetra:** Hembras que presentaron signos clínicos, leucocitosis, HEQ y contenidos intraluminales (HEQ-P; n=31). Veintidós de estas perras mostraron una secreción vulvar purulenta, mientras que las otras 9 no manifestaron descarga vulvar. En base a esto, las mismas se clasificaron como hembras con piómetra a cuello abierto y cerrado,
- **Grupo hiperplasia endometrial quística con contenidos luminales:** Perras sin signos clínicos con GB normales, HEQ y contenidos uterinos intraluminales (HEQ-C; n=15).
- **Grupo hiperplasia endometrial quística sin contenidos luminales:** Perras sin signos clínicos, con GB normal e HEQ sin contenidos luminales asociados (HEQ; n=16)
- **Grupo diestro normal:** Perras sin signos clínicos, hematológicos ni ultrasonográficos (DN; n=28).

#### *Mediciones ultrasonográficas*

Se realizaron evaluaciones ultrasonográficas del útero con un transductor convexo de 6 MHz (Toshiba Core Vision Pro, Japón). Se posicionó a las hembras en decúbito lateral, y se aplicó gel acústico sobre la piel previamente rasurada. Se midieron el diámetro total máximo (D) y el

espesor parietal (P) de los cuernos uterinos inmediatamente después de la bifurcación del cuerpo (Davidson y Baker, 2009).

Con Doppler color se localizaron las arterias uterinas a ambos lados del cuerpo del útero y se obtuvieron los espectros mediante Doppler espectral (Álvarez Clau y Liste, 2005). Se midieron la velocidad de pico sistólico (VPS; m/s) y el flujo de fin de diástole (FFD; m/s), mientras que el índice de resistencia (IR) se calculó automáticamente como  $[IR=(VPS-FFD)/VPS]$ ; Dickey, 1997].

### *Análisis estadístico*

Se comparó el VPS, FFD e IR de las arterias uterinas derecha e izquierda usando un test de Student. Adicionalmente, en HEQ-P se compararon el VPS, FFD e IR de las perras con piómetra a cuello abierto y cerrado utilizando el mismo test. Luego, estas variables fueron analizadas mediante un ANOVA de una vía, seguido por un test de Tukey usando como covariable la edad y el peso de la hembra (SPSS 19.0; SPSS, Chicago, IL, USA). Finalmente, el IR fue correlacionado con D y con P utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Todos los datos fueron presentados como media $\pm$ EEM y se consideró como significativo un valor de  $p<0,05$ .

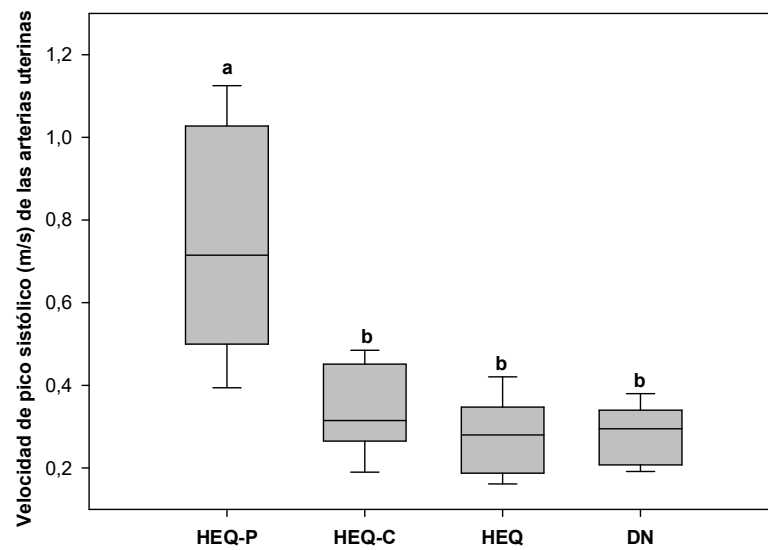
### **3. Resultados**

No se observaron diferencias para VPS ( $p>0,1$ ), FFD ( $p>0,1$ ) o RI ( $p>0,1$ ) entre las arterias uterinas derecha e izquierda en ningún grupo, así como tampoco entre las perras con piómetra

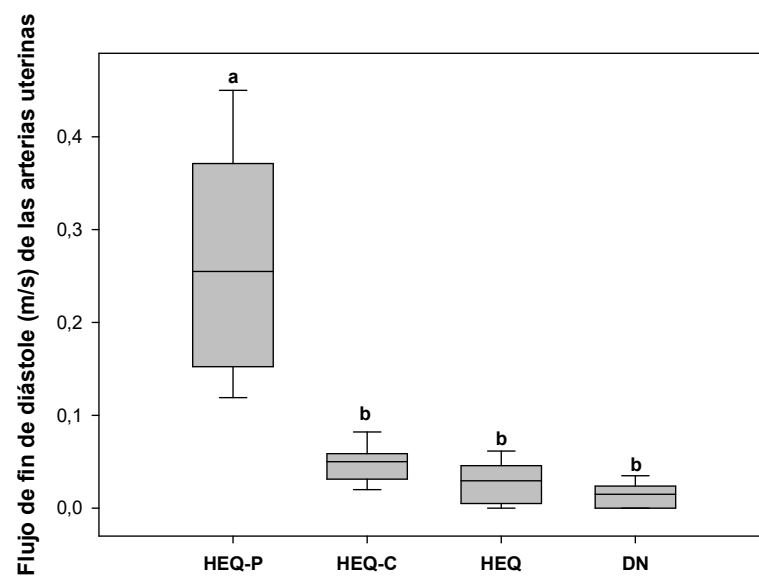
a cuello abierto y cerrado ( $p>0,1$ ). Por lo tanto, los resultados fueron calculados incluyendo las dos arterias y las hembras de HEQ-P fueron analizadas todas juntas independientemente del estado del cuello uterino. En este grupo, las ondas se caracterizaron por presentar un flujo diastólico que se extendió hasta el siguiente ciclo cardíaco. En HEQ-C y HEQ, el FFD fue registrado en 14 de 15 casos y 12 de 16 casos, respectivamente. En DN, 10 de 28 perras no mostraron FFD.

El PVS ( $p<0,01$ ; Fig. 1) y el FFD ( $p<0,01$ ; Fig. 2) fueron más altos en HEQ-P que en HEQ-C, HEQ y DN, mientras que no hubo diferencias en estos parámetros entre los últimos tres grupos ( $p>0,1$ ).

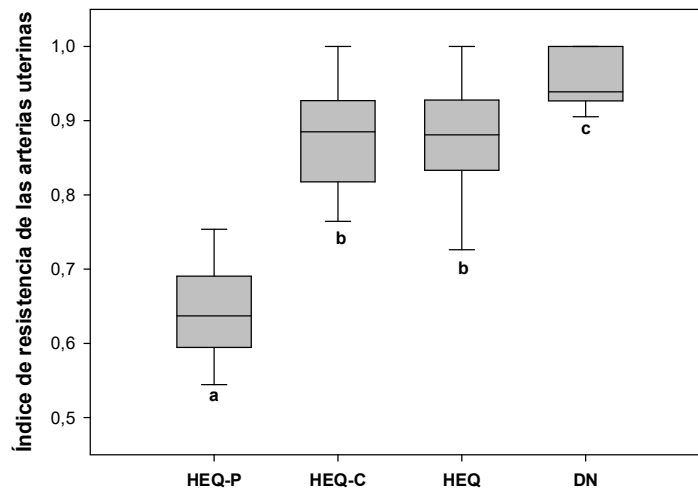
Inversamente, el IR mostró valores más bajos en HEQ-P que en los otros tres grupos ( $p<0,01$ ; Fig. 3). Adicionalmente, DN presentó un IR más alto que HEQ-C y HEQ ( $p<0,01$ ), mientras que en entre estos dos grupos el IR no difirió ( $p>0,1$ ). No se encontró influencia del peso y edad en el PVS, FFD e IR ( $p>0,1$ ). Cuando todas las perras fueron consideradas en su totalidad, la correlación entre el IR y D fue  $r=-0,69$  ( $p<0,01$ ) y entre IR y P fue  $r= -0,02$  ( $p>0,1$ ).



**Figura 1:** Velocidad de pico sistólico (media±EEM) de 90 hembras caninas en diestro con signos clínicos, leucocitosis y contenido uterino intraluminal (HEQ-P; n=31), perras sin signos clínicos con conteo de GB normal y HEQ con (HEQ-C; n=15) y sin contenidos intraluminales (HEQ; n=16) y hembras en diestro normal (DN; n=28). Las diferentes letras indican diferencias ( $p<0,01$ ) entre los grupos.



**Figura 2:** Flujo de fin de diástole (media±EEM) de las mismas perras de la Figura 1. Las diferentes letras indican diferencias ( $p<0,01$ ) entre los grupos.



**Figura 3:** Índice de resistencia (media±EEM) de las mismas perras de la Figura 1. Las diferentes letras indican diferencias ( $p<0,01$ ) entre los grupos.

## Discusión

Este estudio demostró que los parámetros hemodinámicos varían en las distintas condiciones patológicas uterinas, haciendo de la ultrasonografía Doppler un método que permitiría diferenciarlas. El flujo sanguíneo de las arterias uterinas en las hembras normales se caracterizó por ondas de alta resistencia, mientras que en HEQ-P las ondas fueron de baja resistencia. Sumando a esto, en los grupos HEQ y HEQ-C, el flujo uterino fue más alto que en los animales normales pero más bajo que en HEQ-P.

Los hallazgos de este estudio son concomitantes con reportes previos en mujeres y vacas, en los que las infecciones uterinas estuvieron asociadas con un elevado flujo sanguíneo uterino (Alataş y col., 1996; Özbay y Deveci, 2011; Debertolis y col., 2015). Sumado a esto, el alto IR de DN versus el de HEQ y HEQ-C está en línea con un reporte previo en caninos (Veiga y



col., 2012), pero contrasta con otro, en el que el IR de las perras normales en diestro fue más bajo que en perras con HEQ (England y col., 2012). Inclusive, en el presente estudio los valores de IR encontrados en DN y HEQ fueron más altos que aquellos reportados por England y col. (2012) para 12 perras, pero fueron similares a otro reporte previo en perras en diestro normal (Blanco y col., 2011).

Ante la presencia de un proceso inflamatorio, en los tejidos afectados se produce un incremento en el flujo de sangre, vasodilatación y angiogénesis (Özbay y Deveci, 2011). En mujeres, este fenómeno redundaría en una disminución de los valores del IR de las arterias uterinas cuando se presenta inflamación de las estructuras uterinas asociada a un proceso infeccioso (Özbay y Deveci, 2011). Sumado a esto, un estudio previo en perras con piómetra mostró un incremento en las concentraciones de prostaglandina E (Heap y Poyster, 1975), lo que puede derivar en un incremento del flujo sanguíneo uterino (Still y Greiss, 1978).

Asimismo, la liberación local de óxido nítrico, un potente vasodilatador, durante la inflamación endometrial se ha reportado en varias especies (Roselli y col., 1998; Fang y col., 1999).

Aunque en estos animales el incremento del diámetro uterino fue acompañado por una disminución del IR, puede sugerirse que la presencia o ausencia de un proceso inflamatorio es la causa principal de las variaciones del IR.

La evaluación del flujo sanguíneo uterino es una técnica sencilla de ejecutar con el equipamiento adecuado y tiene el potencial de proveer información útil en condiciones patológicas uterinas. La baja resistencia vascular uterina detectada por ultrasonografía Doppler en HEQ-P en comparación con HEQ-C puede ser usada para respaldar el diagnóstico presuntivo de piómetra. En este estudio, ninguna de las perras del grupo HEQ-C tuvo un IR menor a 0,72, de manera que tal valor podría utilizarse como valor de corte para el

diagnóstico diferencial entre HEQ-P y HEQ-C. De todas formas, se necesitan más estudios para determinar los rangos de referencia de dicho índice para cada enfermedad, así como también para evaluar el valor predictivo del mismo. Sumado a esto, en la mujer se ha demostrado que la ultrasonografía Doppler es además una herramienta útil para evaluar la respuesta al tratamiento médico de las enfermedades uterinas (Tinkanen y Kujansuu, 1993). La posibilidad de realizar un seguimiento de la evolución de perras tratadas médicamente podría contribuir a un óptimo resultado terapéutico, evitando una cirugía innecesaria y preservando el tracto genital, sobre todo en perras de alto valor reproductivo.

Concluimos que el flujo sanguíneo de las arterias uterinas en perras con piómetra fue más alto que en las perras normales y con hiperplasia endometrial. Inclusive la hiperplasia endometrial, acompañada o no de contenidos luminales, tuvo un flujo uterino más alto que el útero normal. Los parámetros hemodinámicos podrían ser marcadores útiles para diferenciar condiciones patológicas del útero en caninos.

## Referencias

- Alataş C, Aksoy E, Akarsu C, Yakin K, Bahçeci M. Hemodynamic assessment in pelvic inflammatory disease by transvaginal color Doppler ultrasonography. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1996; 70: 75-78.
- Álvarez-Clau A, Liste F. Ultrasonographic characterization of the uterine artery in the nonestrus bitch. *Ultrasound Med Biol.* 2005; 3: 583–587.
- Batista PR, Gobello C, Corrada Y, Pons E, Arias DO, Blanco PG. Doppler ultrasonographic assessment of uterine arteries during normal canine puerperium. *Anim Reprod Sci.*

2013; 141: 172-176.

Bigliardi E, Prmigliani E, Cavirani S, Luppi A, Bonati L, Corradi A. Ultrasonography and cystic hyperplasia–pyometra complex in the bitch. *Reprod Domest Anim.* 2004; 39: 136–140.

Blanco PG, Tórtora M, Rodríguez R, Arias D, Gobello C. Ultrasonographic assessment of maternal cardiac function and peripheral circulation during normal gestation in dogs. *Vet J.* 2011; 190: 154-159.

Davidson AP, Baker TW. Reproductive ultrasound of the bitch and queen. *Top Companion Anim Med.* 2009; 24: 55–63.

Debertolis L, Mari G, Merlo B, Merbach S, Schoon HA, Iacono E, Bollwein H. Effects of an induced endometritis on uterine blood flow in cows evaluated by transrectal Doppler sonography. *J Vet Sci.* 2015, en prensa.

Dickey RP. Doppler ultrasound investigation of uterine and ovarian blood flow in infertility and early pregnancy. *Hum Reprod Update.* 1997; 3: 467-503.

Dow C. The cystic endometrial hyperplasia–pyometra complex in the bitch. *Vet Rec.* 1958; 70: 1102–1108.

Emoto M, Tamura R, Shirota K, Hachisuga T, Kawarabayashi T. Clinical usefulness of color Doppler ultrasound in patients with endometrial hiperplasia and carcinoma. *Cancer.* 2002; 94: 700-706.

England G, Yeager A, Concannon, PW. Ultrasound imaging of the reproductive tract of the bitch. En: Concannon PW, Verstegen J, England G, eds. *Recent Advances in Small Animal Reproduction.* Ithaca, NY: IVIS; 2003 (<http://www.ivis.org>), Document A1226.0303.

- England GCW, Moxon R, Freeman SL. Delayed uterine fluid clearance and reduced uterine perfusion in bitches with endometrial hyperplasia and clinical management with postmating antibiotic. *Theriogenology*. 2012; 78: 1611-1617.
- Fang L, Nowicki BJ, Dong YL, Yallampalli C. Localized increase in nitric oxide production and the expression on nitric oxide synthase isoforms in rat uterus with experimental intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol*. 1999; 181: 601-609.
- Freeman SL, Russo M, England GC. Uterine artery blood flow characteristics assessed during oestrus and the early luteal phase of pregnant and non-pregnant bitches. *Vet J*. 2013; 197: 205-210.
- Hagman R. Clinical and molecular characteristics of pyometra in female dogs. *Reprod Dom Anim*. 2012; 47: 323–325.
- Heap RB, Poyster NL. Prostaglandins in pyometrial fluid from the cow, bitch ad ferret. *Br J Pharmac*. 1975; 55: 515-518.
- Heppelmann M, Weinert M, Brömmeling A, Piechotta M, Hoedemaker M, Bollwein H. The effect of puerperal uterine disease on uterine involution in cows assessed by Doppler sonography of the uterine arteries. *Anim Reprod Sci*. 2013; 143: 1-7.
- Mateus L, Eilts BE. Cystic endometrial hyperplasia and pyometra. En: Ettinger SJ, Feldman EC, eds., *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; 2010 p. 1913-1920.
- Nyland TG, Mattoon JS. Ovaries and uterus. En: Nyland TG and Mattoon JS, eds. *Small animal diagnostic ultrasound*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 2002 p. 231–249.
- Özbay K, Deveci S. Relationships between transvaginal colour Doppler findings, infectious parameters and visual analogue scale scores in patients with mild acute pelvic inflammatory disease. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011; 156: 105-108.

- Pretzer S. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. *Theriogenology*. 2008; 70: 359–363.
- Rosselli M, Keller PJ, Rubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update*. 1998; 4: 3-24.
- Schlafer D, Gifford A. Cystic endometrial hyperplasia, pseudo-placentational endometrial hyperplasia, and other cystic conditions of the canine and feline uterus. *Theriogenology*. 2008; 70: 349–358.
- Schlafer, D. Diseases of the Canine Uterus. *Reprod Dom Anim*. 2012; 47: 318–322.
- Smith FO. Canine pyometra. *Theriogenology*. 2006; 66: 610-612.
- Still JG, Greiss FC Jr. The effect of prostaglandins and other vasoactive substances on uterine blood flow and myometrial activity. *Am J Obstet Gynecol*. 1978; 130: 1-8.
- Tinkanen H, Kujansuu E. Doppler ultrasound findings in tubo-ovarian infectious complex. *J Clin Ultrasound*. 1993; 21: 175-178.
- Veiga GAL, Angrimani DRS, Szulczewiski CR, Celeghini ECC, Papa PC, Vannucchi CI. Uterine Doppler velocimetry in bitches with cystic endometrial hyperplasia – pyometra. En: *Proceedings of the 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*, 2012, Whistler, Canadá.
- Wilborn RR y Maxwell HS. Clinical approaches to infertility in the bitch. *Vet Clin Small Anim*. 2012; 42: 457-468.

## CONCLUSIONES FINALES

El monitoreo de los cambios gestacionales en el flujo sanguíneo uterino ha demostrado ser una herramienta útil para el control de la preñez canina. Las perras de raza pequeña presentan un aumento progresivo de la perfusión uterina durante la gestación normal. Los rangos de referencia para el IR en estas razas son de 0,60 a 0,84 para el día 30, de 0,53 a 0,79 para el día 40, de 0,48 a 0,76 para el día 50 y de 0,49 a 0,69 para el día 60. Estos rangos permitirán el diagnóstico de posibles alteraciones obstétricas en estas razas.

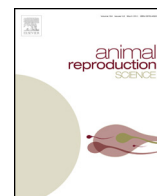
El descenso abrupto de los requerimientos uterinos de sangre durante la primera semana posparto se refleja en una disminución marcada del flujo sanguíneo de las arterias uterinas. El flujo continúa decreciendo de manera lenta a lo largo de las semanas subsiguientes, acompañando los cambios estructurales regenerativos uterinos. Esta disminución de la demanda uterina de sangre, se refleja además en una caída de la función sistólica y de la contractilidad del ventrículo izquierdo para la primera semana posparto. Asimismo, el volumen sistólico y el gasto cardíaco disminuyen de manera progresiva a lo largo del puerperio, mientras que la presión arterial sistémica se incrementa durante este período. La lenta involución de estos parámetros podría ser influenciada por las demandas metabólicas propias de la lactancia. Por otro lado, la hipertrofia ventricular no parece revertirse durante en los primeros 80 días posparto. Adicionalmente, la frecuencia cardíaca y el intervalo QT corregido disminuyen progresivamente durante el puerperio, mientras que la amplitud de la onda P y la amplitud del complejo QRS aumentan hacia el final de este período. Todos los cambios electrocardiográficos podrían estar influenciados por la interacción entre la caída de la volemia, la activación de canales de potasio en el miocardio y la acción la oxitocina, como consecuencia del parto y la lactancia.

De la misma manera, la presencia de estados patológicos uterinos modifica el comportamiento del flujo sanguíneo en el útero. Las perras con piómetra presentan un flujo sanguíneo de las arterias uterinas mayor que las perras normales y con hiperplasia endometrial quística (HEQ), acompañada o no de coelctas intraluminales. Asimismo, las perras con HEQ muestran un flujo uterino más alto que las hembras en diestro normal. El comportamiento de los parámetros hemodinámicos uterinos parece ser un indicador útil en la diferenciación de las condiciones patológicas del útero.

Este Trabajo de Tesis aporta información acerca del comportamiento cardiovascular en diversas condiciones fisiológicas y patológicas del útero canino, colaborando en el desarrollo de la ultrasonografía bidimensional y Doppler y la electrocardiografía como herramientas diagnósticas. La aplicabilidad de estas técnicas en la detección de alteraciones puerperales o en la evaluación de la respuestas terapéuticas en distintas metropatías son algunos objetivos de futuras investigaciones. Finalmente, el conocimiento de los cambios cardiovasculares asociados a distintas condiciones fisiológicas y patológicas uterinas contribuye al mejoramiento de la eficiencia reproductiva de la especie canina.

# ANEXOS





## Doppler ultrasonographic assessment of uterine arteries during normal canine puerperium



P.R. Batista<sup>a,\*</sup>, C. Gobello<sup>b</sup>, Y. Corrada<sup>b</sup>, E. Pons<sup>c</sup>, D.O. Arias<sup>a</sup>, P.G. Blanco<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Cardiology Laboratory, Faculty of Veterinary Sciences, National University of La Plata (FVS-NULP), 60 y 118, La Plata 1900, Argentina

<sup>b</sup> Laboratory of Reproductive Physiology, FVS-NULP, La Plata, Argentina

<sup>c</sup> Imaging Diagnosis Service, FVS-NULP, La Plata, Argentina

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 December 2012

Received in revised form 1 July 2013

Accepted 30 July 2013

Available online 6 August 2013

#### Keywords:

Doppler  
Ultrasound  
Postpartum  
Dog  
Uterus  
Blood flow

### ABSTRACT

The aim of this study was to describe Doppler ultrasonographic changes of uterine arteries during normal canine puerperium. Eight healthy, pure-bred bitches, were ultrasonographically assessed during the postpartum period on Days –3, 3, 10, 17, 24, 38, 52 and 80 (Day 0 defined as the day of parturition). Total horn diameters (TD) and endometrium thickness (*E*) were evaluated. Color Doppler was used to localize uterine arteries at both sides of the body and pulsed-wave Doppler was performed to obtain the waveforms. Peak systolic velocity (PSV) and end diastolic velocity (EDV) were measured. Resistance index [(PSV – EDV)/PSV] was automatically calculated.

Values of TD, *E*, PSV, EDV and RI were analyzed by repeated measures ANOVA followed by LSD test (SPSS 18.0; SPSS, Chicago, IL, USA). A correlation analysis was also carried out between RI and TD. A progressive decrease of TD ( $P < 0.01$ ) and *E* ( $P < 0.01$ ) was found in the course of the study. A gradual diminution of PSV ( $P < 0.01$ ) and EDV ( $P < 0.01$ ) and an increase of RI ( $P < 0.01$ ) were also found throughout the study period. The resistance index negatively correlated with TD ( $r = -0.46$ ;  $P < 0.01$ ) and *E* ( $r = -0.44$ ;  $P < 0.01$ ) while the ultrasonographic and vascular changes in this period are concurrent with regenerative changes in the glandular and epithelial structures of the uterus. It is concluded that uterine artery RI progressively increased during normal canine puerperium, associated to the two-dimensional ultrasonographic regression of the organ.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

In mammalian species, the puerperium is a physiological period during which the female reproductive tract prepares to return to cyclicity (Orfanou et al., 2009; Mulic-Lutvica et al., 2001). In dogs, the vulvar discharge indicative of clinical puerperium is present for 4–7 weeks after parturition (Orfanou et al., 2008; Feldman and Nelson, 2004; Dickie and Arbeiter, 1993). Furthermore, the presence of placental sites and trophoblast-like cells has been considered a normal feature of uterine involution up to Day

84 after whelping (Al-Bassam et al., 1981; Orfanou et al., 2009).

In canine species, there are only two ultrasonographic reports of normal uterine involution during puerperium. Pharr and Post (1992) who described these changes during the first 24 days after whelping and Yeager and Concannon (1990) who studied uterine shape, echogenicity and diameter during 15 weeks. Immediately after whelping, the uterus was enlarged and echogenic presenting thick and irregular walls (Pharr and Post, 1992). Following this prolonged gradual involution of the uterus, which exceeds previous histological reports (Al-Bassam et al., 1981), was found (Yeager and Concannon, 1990).

Doppler ultrasound is a non invasive technique that provides information about the characteristics of the arterial blood flow and the organ perfusion (Fielder and Baker,

\* Corresponding author. Tel.: +54 221 423 6663; fax: +54 221 427 7378.  
E-mail addresses: [pmatista@fcv.unlp.edu.ar](mailto:pmatista@fcv.unlp.edu.ar), [prbatista.mv@gmail.com](mailto:prbatista.mv@gmail.com) (P.R. Batista).

1969). This technique has been used to evaluate uterine arteries blood flow in many species, including dogs (Blanco et al., 2008). In bitches, the resistance index (RI) of this artery decreases during normal (Nautrup, 1998; Di Salvo et al., 2006; Blanco et al., 2011a,b) but not in abnormal gestations (Blanco et al., 2011a,b).

Uterine vascular changes during puerperium have been reported in women (Jaffa et al., 1996; Mulic-Lutvica et al., 2007), cows (Krueger et al., 2009) and mares (Mortensen et al., 2011). In these species, a progressive increase in RI was found throughout the postpartum period. Conversely, uterine arteries RI does not change after parturition in women showing puerperal endometritis, uterine subinvolution, delayed placental separation or impaired wound healing after C-section (Kirkinen et al., 1988; Nakai et al., 1997; Mulic-Lutvica et al., 2009).

Although characterization of postpartum uterine blood flow by Doppler ultrasound will probably contribute to the precocious diagnosis of postpartum diseases, this technique has not been used in puerperal bitches thus far. Therefore, the aim of this study was to describe Doppler ultrasonographic changes in uterine arteries during normal canine puerperium.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

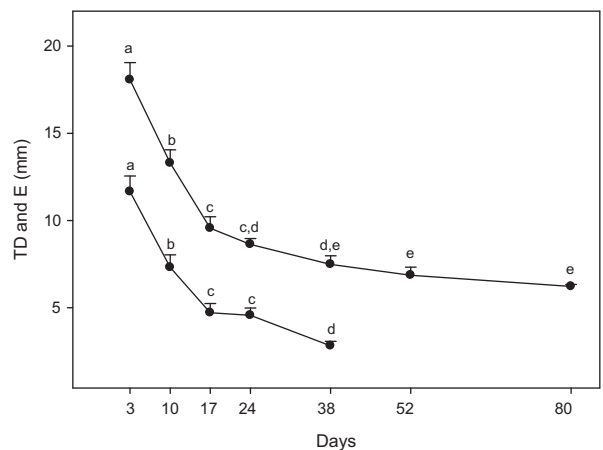
Eight clinically healthy,  $3.25 \pm 0.25$  (1–5) year-old, pure-breed (5 Miniature Poodle, 1 Yorkshire Terrier, 1 Chihuahua and 1 Bichon Frise) pregnant bitches, weighing  $3.68 \pm 0.38$  (2.5–6) kg were included in this study. Pregnancy was confirmed by two-dimensional ultrasonographic examination in all the cases (Day –3; England et al., 2003). The females were multiparous and had a history of normal whelping.

### 2.2. Ultrasonographic follow up

The bitches were ultrasonographically evaluated on Day –3 and then on Days 3, 10, 17, 24, 38, 52 and 80 after delivery. Day 0 was defined as the day of parturition. Two-dimensional and Doppler ultrasonographic evaluations were carried out with a 7.5–8 MHz linear transducer (Toshiba Core Vision Pro, Japan). The dogs were positioned in lateral recumbency, acoustic gel was applied to the transducer and coupled directly to the clipped skin. The uterine body was observed with two-dimensional ultrasound in a transversal axis (Davidson and Baker, 2009). At each evaluation time point after whelping, both uterine horns were assessed immediately after body bifurcation (Yeager and Concannon, 1990).

Total diameter (TD; mm) and endometrium thickness (*E*; mm) were measured in the transverse section of the uterine horn (Yeager and Concannon, 1990). The endometrium was identified as a moderately echogenic ring, which was surrounded by a hypoechoic ring of myometrium (Pharr and Post, 1992).

Color Doppler was used to localize uterine arteries at both sides of the uterine body and pulsed-wave Doppler was performed to obtain the waveforms (Alvarez-Clau and Liste, 2005). The angle of insonation was manually



**Fig. 1.** Total uterine diameter (TD; mean ± SEM; solid circles) and endometrium thickness (*E*; mean ± SEM; empty circles) of eight female dogs during normal puerperium. For each variable, different letters indicate differences ( $P < 0.05$ ) among days.

corrected according to previous reports (Köster et al., 2001; Di Salvo et al., 2006; Scotti et al., 2008 and Polisca et al., 2010). Measurements with an angle  $< 20^\circ$  were only considered for analysis. Three consecutive waveforms with maximum Doppler shift were included in the study (Köster et al., 2001). Peak systolic velocity (PSV; cm/s) and end diastolic velocity (EDV; cm/s) were measured while RI [(PSV – EDV)/PSV] was automatically calculated (Dickey, 1997).

### 2.3. Statistical analysis

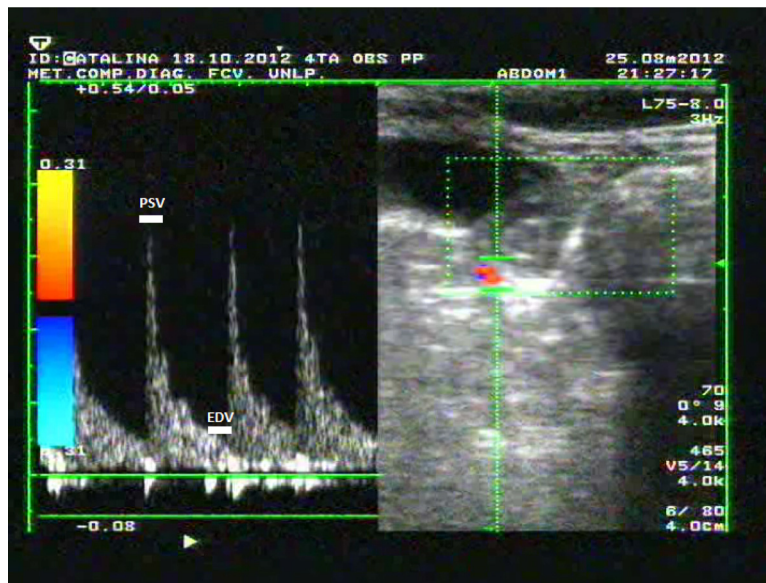
Values of TD, *E*, PSV, EDV and RI were analyzed by repeated measures ANOVA followed by LSD test (SPSS 19.0; SPSS, Chicago, IL, USA). To further interpret the findings, RI was correlated with both TD and *E* using Pearson's correlation test.  $P < 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

All the females whelped normally (2–5 healthy puppies), had an uneventfully clinical puerperium (Orfanou et al., 2008) and weaned their puppies on Day 60. Both TD ( $P < 0.01$ ) and *E* ( $P < 0.01$ ) progressively decreased in the course of the puerperium (Fig. 1). Endometrium was ultrasonographically observed up to Day 38. No differences were found between right and left PSV ( $P > 0.1$ ), EDV ( $P > 0.1$ ) and RI ( $P > 0.1$ ), therefore values were averaged. Original recording of pulsed-wave Doppler ultrasound of the left uterine artery is shown in Fig. 2. A gradual diminution of PSV ( $P < 0.01$ ; Fig. 3) and EDV ( $P < 0.01$ ; Fig. 4) and an increasing RI ( $P < 0.01$ ; Fig. 5) were also found throughout the study period. Resistance index was negatively correlated with TD ( $r = -0.46$ ;  $P < 0.01$ ) and *E* ( $r = -0.44$ ;  $P < 0.01$ ).

## 4. Discussion

In the course of this study, uterine dimensions and blood flow progressively decreased, indicating a normal



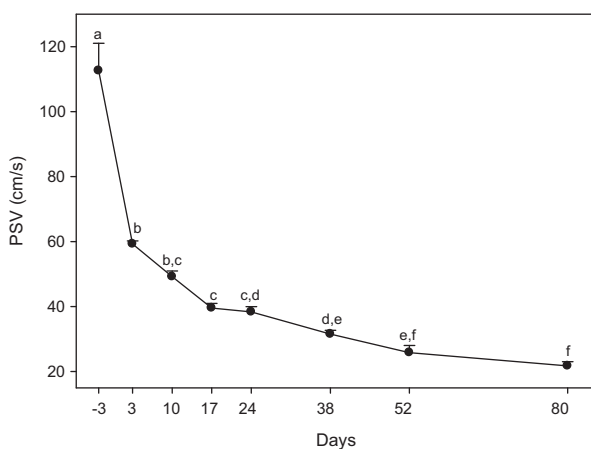
**Fig. 2.** Pulsed-wave Doppler ultrasound register of uterine artery in a selected pregnant bitch 24 days after parturition. The cursor was positioned on the artery. PVS is the peak systolic velocity and EDV the end diastolic velocity.

involution of the organ throughout puerperium. These findings are concomitant with the regenerative uterine changes in glandular and epithelial structures previously described for dogs after parturition (Orfanou et al., 2009; Chu et al., 2002). Uterine horns diameter diminished up to Day 38, which is in line with a previous report in dogs (Yeager and Concannon, 1990). Conversely, endometrial layer was ultrasonographically distinguished up to Day 52. According to a microscopic study in this species, placental site involution is almost complete at the beginning of the eighth week (Day 56) after parturition (Al-Bassam et al., 1981) at which the endometrium is lined by a single layer of foamy columnar epithelial cells. This histological description justifies the inability to ultrasonographically detect the endometrium after Day 52 in the present study.

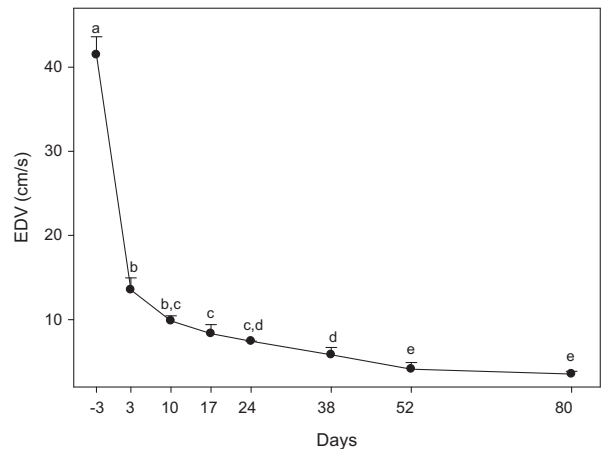
Conversely, Yeager and Concannon (1990) was able to visualize this layer up to Day 84 in four out of five Beagle bitches.

In this study, ultrasonographic appearance of the canine uterus became indistinguishable from that of anestrus the last two examinations (Days 52 and 80), while Yeager and Concannon (1990) found this hypoechoic image beyond Day 100. These variations in endometrium and uterine ultrasound involution between studies may be due to the differences in maternal weight and litter size between reports. The present results seem to confirm that uterine ultrasonographic involution occurs before that previously described in histological studies (Day 84; Al-Bassam et al., 1981; Orfanou et al., 2009).

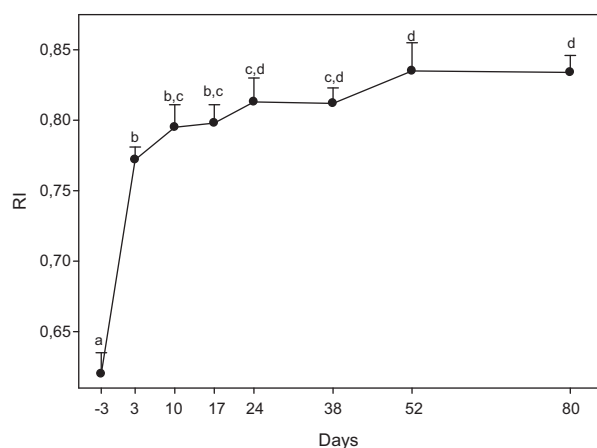
As expected, in these animals uterine blood flow progressively decreased during normal puerperium. Peak systolic velocity and EDV of uterine artery diminished in



**Fig. 3.** Peak systolic velocity (PSV; mean  $\pm$  SEM) of the same dogs of Fig. 1. Different letters indicate differences ( $P < 0.05$ ) among days.



**Fig. 4.** End diastolic velocity (EDV; mean  $\pm$  SEM) of the same dogs of Fig. 1. Different letters indicate differences ( $P < 0.05$ ) among days.



**Fig. 5.** Resistance index (RI) of uterine artery (mean  $\pm$  SEM) of the same dogs of Fig. 1. Different letters indicate differences ( $P < 0.05$ ) among days.

the course of the study, while RI increased. The resistance index increase is consistent with a previous report in dogs (Batista et al., 2012) and also in other species (Jaffa et al., 1996; Mulic-Lutvica et al., 2007; Krueger et al., 2009; Mortensen et al., 2011), in which RI increased markedly during the first days postpartum and then moderately up to involution. An explanation for this biphasic decrease in the uterine blood flow is the abrupt decrease of the uterine size that occurs the first week after parturition.

The outward hypertrophic remodeling of the uterine artery is a gestational event characterized by the artery luminal increase that has been described in rats (Cipolla and Osol, 1994), mice (van der Heijden et al., 2005) and sheep (Annibale et al., 1989). The involution of this arterial hypertrophy is a consequence of endothelial cells apoptosis in mice that leads to a decrease in uterine artery blood flow (van der Heijden et al., 2009). A similar process might also be present in dogs, although it remains to be described.

Despite the fact that the uterine artery RI remained unchanged from Day 24 to the end of the experiment, in this period, it was lower than values previously reported for anestrous dogs (Alvarez-Clau and Liste, 2005), suggesting a slow return to the non-pregnant conditions. A similar situation can be observed in women and cows, where increased peripheral resistance of uterine arteries exceeds clinical uterine involution (Tekay and Jouppila, 1993; Jaffa et al., 1996; Krueger et al., 2009).

Finally, Doppler ultrasound seems to be a useful tool for assessing changes in uterine artery blood flow during physiological canine puerperium and, therefore, for the early detection of postpartum disorders. It is concluded that the uterine artery RI progressively increased during normal canine puerperium which is associated with the two-dimensional ultrasonographic regression of the organ. Further work is still necessary to evaluate the influence of litter size, maternal age and weight, parity, lactation and C-section on postpartum remodeling process.

### Acknowledgments

This study was partially funded by the University Incentive Program of Teaching and Research 11/V195. The

authors are Career Scientists (CG, YC and PGB) and Research Fellow (PRB) of the National Research Council (CONICET) of Argentina.

### References

- Al-Bassam, M.A., Thompson, R.G., O'Donnell, L., 1981. Normal postpartum involution of the uterus in the dog. *Can. J. Comp. Med.* 45, 217–232.
- Alvarez-Clau, A., Liste, F., 2005. Ultrasonographic characterization of the uterine artery in the nonestrous bitch. *Ultrasound Med. Biol.* 3, 583–587.
- Annibale, D.J., Rosenfeld, C.R., Kamm, K.E., 1989. Alterations in vascular smooth muscle contractility during ovine pregnancy. *Am. J. Physiol.* 256, 1282–1288.
- Batista, P.R., Blanco, P.G., Tórtora, M., Arias, D.O., Corrada, Y.A., Gobello, C., 2012. Doppler ultrasonographic assessment of uterine arteries during normal canine puerperium. In: *Proceedings of the 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*, Whistler, Canada, pp. 17–18.
- Blanco, P.G., Arias, D.O., Gobello, C., 2008. Doppler ultrasound in canine pregnancy. *J. Ultrasound Med.* 27, 1745–1750.
- Blanco, P.G., Rodríguez, R., Rube, A., Arias, D.O., Tórtora, M., Díaz, J.D., Gobello, C., 2011a. Doppler ultrasonographic assessment of maternal and fetal blood flow in abnormal canine pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 126, 130–135.
- Blanco, P.G., Tórtora, M., Rodríguez, R., Arias, D., Gobello, C., 2011b. Ultrasonographic assessment of maternal cardiac function and peripheral circulation during normal gestation in dogs. *Vet. J.* 190, 154–159.
- 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.
- Cipolla, M., Osol, G., 1994. Hypertrophic and hyperplastic effects of pregnancy on the rat uterine arterial wall. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171, 805–811.
- Davidson, A.P., Baker, T.W., 2009. Reproductive ultrasound of the bitch and queen. *Top. Companion Anim. Med.* 24, 55–63.
- Di Salvo, P., Bocci, F., Polisca, A., 2006. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in the bitch. *Res. Vet. Sci.* 81, 382–388.
- Dickey, R.P., 1997. Doppler ultrasound investigation of uterine and ovarian blood flow in infertility and early pregnancy. *Hum. Reprod. Update* 3, 467–503.
- Dickie, M.B., Arbeiter, K., 1993. Diagnosis and therapy of the subinvolution of placental sites in the bitch. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 47, 471–475.
- England, G., Yeager, A., Concannon, P.W., 2003. Ultrasound imaging of the reproductive tract of the bitch. In: Concannon, P.W., Verstegen, J., England, G. (Eds.), *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. IVIS, Ithaca, NY (<http://www.ivis.org>), document A1226.0303.
- Feldman, E.C., Nelson, R.W., 2004. Breeding, pregnancy and parturition. In: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Saunders, Philadelphia, pp. 775–776.
- Fielder, F.D., Baker, R.F., 1969. Diagnostic applications of Doppler ultrasound. *Ultrasonics* 7, 36–38.
- Jaffa, A.J., Wolman, I., Har-Toov, J., Amster, R., Peyser, M.R., 1996. Changes in uterine artery resistance to blood flow during puerperium – a longitudinal study. *J. Matern. Fetal Invest.* 6, 27–30.
- Kirkinen, P., Dudenhausen, J., Baumann, H., Huch, A., Huch, R., 1988. Postpartum blood flow velocity waveforms of the uterine arteries. *J. Reprod. Med.* 33, 745–748.
- Köster, K., Poulsen Nautrup, C., Günzel-Apel, A.R., 2001. A Doppler ultrasonographic study of cyclic changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch. *Reproduction* 122, 453–461.
- Krueger, L., Koerte, J., Tsousis, G., Herzog, K., Flachowsky, G., Bollwein, H., 2009. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during the first 12 weeks after parturition in healthy dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 114, 23–31.
- Mortensen, C., Kelley, D., Warren, L., 2011. Supplemental L-arginine shortens gestation length and increases mare uterine blood flow before and after parturition. *J. Equine Vet. Sci.* 31, 514–520.
- Mulic-Lutvica, A., Bakos, O., Bekuretzion, M., Axelsson, O., 2001. Ultrasonic evaluation of the uterus and uterine cavity after normal, vaginal delivery. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 18, 491–498.
- Mulic-Lutvica, A., Eurenium, K., Axelsson, O., 2007. Longitudinal study of Doppler flow resistance indices of the uterine arteries after normal vaginal delivery. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 86, 1207–1214.
- Mulic-Lutvica, A., Eurenium, K., Axelsson, O., 2009. Uterine artery Doppler ultrasound in postpartum women with retained placental tissue. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 88, 724–728.

- Nakai, Y., Imanaka, M., Nishio, J., Maeda, T., Ozaki, A., Sun, T.T., Ogita, S., 1997. Uterine blood flow velocity waveforms during early postpartum course following caesarean section. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 74, 121–124.
- Nautrup, C.P., 1998. Doppler ultrasonography of canine maternal and fetal arteries during normal gestation. *J. Reprod. Fertil.* 112, 301–314.
- Orfanou, D.C., Ververidis, H.N., Poulis, A., Fragkou, I.A., Kokoli, A.N., Boscus, C.M., Taitzoglou, I.A., Tzora, A., Nerou, C.M., Athanasiou, L., Fthenakis, G.C., 2009. Post-partum involution of the canine uterus – Gross anatomical and histological features. *Reprod. Domest. Anim.* 44, 152–155.
- Orfanou, D.C., Ververidis, H.N., Poulis, A., Fragkou, I.A., Kokoli, A.N., Boscus, C.M., Taitzoglou, I.A., Tzora, A., Nerou, C.M., Athanasiou, L., Fthenakis, G.C., 2008. Experimental study of the postpartum involuting genital tract of the bitch. Part I. Clinical bacteriological and cytological features. *Proceedings of the 6th International Symposium of Canine and Feline Reproduction*, 175–176.
- Pharr, J.W., Post, K., 1992. Ultrasonography and radiography of the canine postpartum uterus. *Vet. Radiol. Ultrasound* 33, 35–40.
- Polisca, A., Scotti, L., Orlandi, R., Brecchia, Boiti, C., 2010. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in rabbits. *Theriogenology* 73, 358–366.
- Scotti, L., Di Salvo, P., Bocci, F., Pieramati, C., Polisca, A., 2008. Doppler evaluation of maternal and foetal vessels during normal gestation in queen. *Theriogenology* 69, 1111–1119.
- Tekay, A., Jouppila, P., 1993. A longitudinal Doppler ultrasonographic assessment of the alterations in peripheral vascular resistance of uterine arteries and ultrasonographic findings of the involuting uterus during the puerperium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 168, 190–198.
- van der Heijden, O.W., Essers, Y.P., Fazzi, G., Peeters, L.L., Mey, J.G., van Eys, G.J., 2005. Uterine artery remodeling and reproductive performance are impaired in endothelial nitric oxide synthase deficient mice. *Biol. Reprod.* 72, 1161–1168.
- van der Heijden, O.W., Essers, Y.P., Wijnands, E., Mey, J.G., Peeters, L.L., van Eys, G.J., 2009. Postpartum reversal of the pregnancy-induced uterine artery remodeling in young, aging, and eNOS-deficient mice. *Reprod. Sci.* 16, 642–649.
- Yeager, A.E., Concannon, P.W., 1990. Serial ultrasonographic appearance of postpartum uterine involution in beagle dogs. *Theriogenology* 34, 523–525.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Theriogenology

journal homepage: [www.theriojournal.com](http://www.theriojournal.com)

# Uterine blood flow evaluation in bitches suffering from cystic endometrial hyperplasia (CEH) and CEH-pyometra complex

P.R. Batista<sup>a,b,\*</sup>, C. Gobello<sup>b,c</sup>, A. Rube<sup>a</sup>, Y.A. Corrada<sup>b,d</sup>, M. Tórtora<sup>a</sup>,  
P.G. Blanco<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Cardiology Laboratory, Clinics Department, Faculty of Veterinary Sciences, National University of La Plata (FVS-NULP), La Plata, Argentina

<sup>b</sup>CONICET, Argentina

<sup>c</sup>Laboratory of Reproductive Physiology, Basic Sciences Department, FVS-NULP, La Plata, Argentina

<sup>d</sup>Teaching Hospital, Clinics Department, FVS-NULP, La Plata, Argentina

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 24 May 2015

Received in revised form 17 October 2015

Accepted 14 December 2015

### Keywords:

Cystic endometrial hyperplasia

Pyometra

Doppler ultrasound

Canine

## ABSTRACT

Doppler ultrasound is a useful diagnosis tool to evaluate uterine blood flow in different canine reproductive states. The aim of this study was to describe and compare uterine blood flow in bitches suffering from cystic endometrial hyperplasia (CEH) and CEH-pyometra complex (CEH-P). Ninety diestrous bitches were clinically, hematologically, and ultrasonographically classified into four groups: (1) clinical signs, leukocytosis, CEH, and uterine luminal contents (CEH-P,  $n = 31$ ); (2) asymptomatic bitches with CEH and uterine contents (CEH-C,  $n = 15$ ); (3) asymptomatic bitches with CEH without uterine contents (CEH,  $n = 16$ ); and (4) normal diestrous bitches (ND,  $n = 28$ ). The widest cross-sectional diameter and uterine wall thickness ( $W$ ) of uterine horns were measured using two-dimensional ultrasound. Peak systolic velocity and end diastolic velocity of uterine arteries were measured by Doppler ultrasound in all the bitches. Peak systolic velocity and end diastolic velocity were higher in CEH-P than in CEH-C, CEH, and ND ( $P < 0.01$ ); although both parameters did not show differences among the latter three groups ( $P > 0.1$ ). Conversely, resistance index (RI) reported lower values in CEH-P than that in the other three groups ( $P < 0.01$ ), being ND higher ( $P < 0.01$ ) than both CEH-C and CEH which did not differ between themselves ( $P > 0.1$ ). When all the bitches were considered, correlation between RI and cross-sectional diameter was  $r = -0.69$  ( $P < 0.01$ ) and between RI and uterine wall thickness was  $r = -0.02$  ( $P > 0.1$ ). It is concluded that the uterine artery blood flow velocity of bitches suffering from pyometra was higher, not only from normal bitches, but also from females with endometrial hyperplasia. Furthermore, endometrial hyperplasia, accompanied or not by luminal contents, had a higher blood flow velocity than normal uterus. Hemodynamic parameters appear as useful markers to differentiate uterine pathologic conditions.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

The cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex (CEH-P) is one of the most prevalent uterine diseases in the female dog [1]. Middle-aged to old, diestrous bitches are frequently affected [1]. Cystic endometrial hyperplasia is a

\* Corresponding author. Tel.: +54 221 423 6663; fax: +54 221 427 7378.

E-mail address: [pbatista@fcv.unlp.edu.ar](mailto:pbatista@fcv.unlp.edu.ar) (P.R. Batista).

subclinical disease characterized by the proliferation of endometrial glands resulting in the formation of fluid-filled cysts and luminal uterine contents may be present in some cases [2,3]. Pyometra, which is associated with purulent contents, presents severe systemic signs of illness because of the bacterial infection [4]. Conversely, when the uterine contents are serous, bloody, or mucoid, the condition is generally not associated with any clinical sign other than infertility [1,5,6]. Sterile uterine fluids can be considered as the initiating stage that progresses into pyometra after uterine bacterial colonization occurs [1].

In dogs, ultrasonographic evaluation of the uterus provides valuable information to diagnose uterine diseases. The thickness of the uterine walls and the presence of luminal contents can be determined, allowing differentiation between pregnancy and pathologic conditions [7–9]. Although it has been reported that the echogenicity of the uterine contents suggests cellularity, it has also been claimed that ultrasonographic differentiation of the contents is difficult [8–10].

Doppler ultrasonography is a noninvasive technique that provides information about the organs perfusion [11]. This technique has found to be a useful tool to diagnose numerous gynecologic lesions in several species [12–14]. In women and cows, uterine pathologic conditions may cause a blood flow increase that can be detected by Doppler ultrasound.

In dogs, this technique has been used to evaluate uterine arteries blood flow during estrus, normal and abnormal pregnancy, and puerperium [15–17]. Although the characterization of uterine blood flow by Doppler ultrasound will probably contribute to the precocious diagnosis of CEH and pyometra, this technique has not been studied in bitches with uterine diseases so far. Thus, the aim of this study was to describe and compare uterine blood flow in normal diestrous bitches and other suffering from CEH and CEH-P complex.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and experimental groups

Ninety, 1 to 14-year-old, 3 to 40 kg, cross, and pure-bred diestrous (15–60 days after the end of the previous estrus) bitches that were admitted in Teaching Hospital of the Faculty of Veterinary Sciences of the National University of La Plata, Argentina from 2009 to 2014 were included in this study. The females were evaluated for presence of clinical signs of systemic illness (fever, inappetance, depression; [18]), and leukocytosis (White blood cell count (WBC) >17,000 cells/mL; [19]). Finally, their uteri were ultrasonographically examined as described in the following (ultrasonographic measurements) and the animals were classified into the following groups:

- pyometra group: the presence of clinical signs, leukocytosis, CEH, and uterine luminal content (CEH-P, n = 31). Twenty-two of these bitches had purulent vulvar discharge, whereas nine bitches showed no

discharge. These animals were classified as open- and closed-cervix pyometra, respectively.

- cystic endometrial hyperplasia with luminal contents: asymptomatic bitches with normal WBC, CEH, and uterine contents (CEH-C, n = 15)
- cystic endometrial hyperplasia without luminal contents: asymptomatic bitches, with normal WBC and CEH without uterine content (CEH, n = 16)
- normal diestrus: bitches having no clinical, hematologic, or ecographic signs (ND, n = 28 [4]).

### 2.2. Ultrasonographic measurements

Two-dimensional ultrasonographic evaluations of the uterus were carried out with a 6-MHz convex transducer (Toshiba Core Vision Pro, Japan). The dogs were positioned in lateral recumbency and gently restrained. No sedation was used. Acoustic gel was applied to the transducer and coupled directly to the clipped skin. The widest cross-sectional diameter (D) and uterine wall thickness (W) of uterine horns were measured immediately after body bifurcation [9].

Color Doppler was conducted to localize uterine arteries at both sides of the uterine body, and pulsed-wave Doppler was performed to obtain the waveforms [20]. The angle of insonation was manually corrected according to previous reports [21]. Measurements with an angle less than 20° were only considered for analysis. Three consecutive waveforms with maximum Doppler shift were included in the study [21]. Peak systolic velocity (PSV; m/s) and end diastolic velocity (EDV; m/s) were measured, whereas resistance index [RI = (PSV–EDV)/PSV] was automatically calculated.

### 2.3. Statistical analysis

Peak systolic velocity, EDV, and RI of the left and right uterine arteries were compared using Student's *t* tests. Also in CEH-P, PSV, EDV, and RI of bitches with open- and closed-cervix pyometra were compared using the same test. Values of PSV, EDV, and RI were analyzed by one way ANOVA followed by Tukey's test, using age and body weight as covariates (SPSS 19.0; SPSS, Chicago, IL, USA). To further interpret the findings, RI was correlated with D and W using Pearson's correlation test. All data were presented as mean ± SEM and *P* < 0.05 was considered significant.

## 3. Results

No differences were observed for PSV (*P* > 0.1), EDV (*P* > 0.5), or RI (*P* > 0.5) between left and right uterine arteries in any group. Thus, results were calculated including both arteries. In addition, no differences were found in PSV, EDV, and RI between bitches with open- and closed-cervix pyometra (*P* > 0.1); therefore, all of these bitches were analyzed together. In CEH-P, the waveforms were characterized by a diastolic flow extending to the next cardiac cycle. In CEH-C and CEH, the EDV was recorded in

14 of 15 cases and 12 of 16 cases, respectively. In ND, 10 of 28 bitches did not show an end diastolic flow.

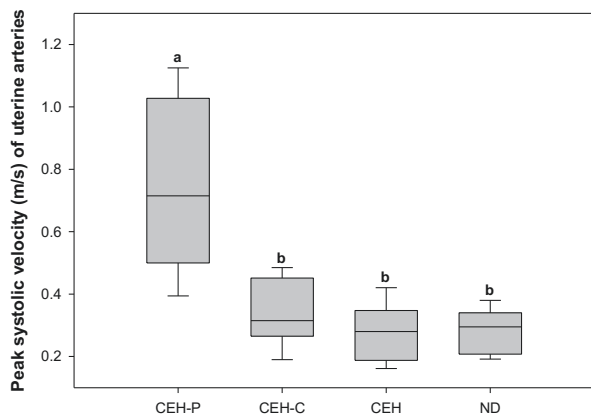
Peak systolic velocity ( $P < 0.01$ ; Fig. 1) and EDV ( $P < 0.01$ ; Fig. 2) were higher in CEH-P than that in CEH-C, CEH and ND, although both parameters did not show differences among the latter three groups ( $P > 0.1$ ). Conversely, RI reported lower values in CEH-P than that in the other three groups ( $P < 0.01$ ; Fig. 3), being ND higher ( $P < 0.01$ ) than both CEH-C and CEH which did not differ between themselves ( $P > 0.1$ ). No influence of age and body weight was found in PSV, EDV, and RI ( $P > 0.1$ ). When all the bitches were considered, correlation between RI and D was  $r = -0.69$  ( $P < 0.01$ ) and between RI and W was  $r = -0.02$  ( $P > 0.1$ ).

#### 4. Discussion

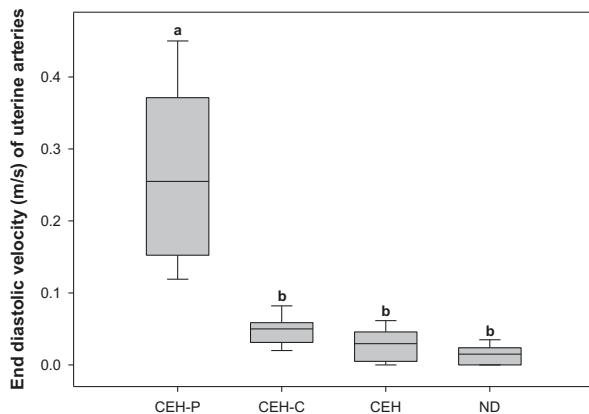
This study reported that Doppler ultrasonography can accurately reflect hemodynamic changes that are present in bitch patients with different uterine pathologic conditions. Although normal bitches presented a significantly higher resistance Doppler waveform of the uterine arteries, the CEH-P Doppler waveforms reported a low resistance pattern. In CEH and CEH-C groups, uterine blood flow was higher than in normal animals but lower than in CEH-P.

These findings are concomitant with previous reports in women, where uterine infection was associated with high uterine blood flow [12,22]. In addition, the high RI of ND versus CEH and CEH-C is in line with a previous canine report [23] but is not in agreement with another one [24], in which RI of normal diestrous bitches was lower than that in bitches suffering from CEH. Moreover, in the present study, RI values found in ND and CEH groups are higher than those reported by England et al. (2012) for 12 bitches but similar to our previous report in normal diestrous female dogs [16].

During an inflammatory response, increased blood flow, vasodilatation, and angiogenesis are present [12]. In



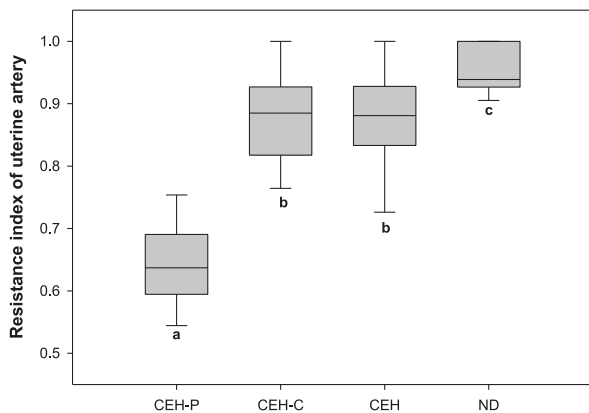
**Fig. 1.** Peak systolic velocity (mean  $\pm$  SEM) of 90 diestrous female dogs with clinical signs, leukocytosis, CEH, and uterine luminal content (CEH-P,  $n = 31$ ), asymptomatic bitches with a normal white blood cell count and CEH with (CEH-C,  $n = 15$ ) and without (CEH,  $n = 16$ ) uterine luminal content and normal diestrous bitches (ND,  $n = 28$ ). Different letters indicate differences ( $P < 0.01$ ) among groups. CEH, cystic endometrial hyperplasia; CEH-P, CEH-pyometra complex.



**Fig. 2.** End diastolic velocity (mean  $\pm$  SEM) of the dogs of Figure 1. Different letters indicate differences ( $P < 0.01$ ) among groups.

women, uterine inflammation associated with an infectious process may lead to a diminution of RI values of uterine arteries [12]. Furthermore, a previous study in bitches with pyometra reported an increase in the intra-uterine concentration of prostaglandin E, which may also lead to an increase in uterine perfusion [25,26]. In addition to prostaglandins, nitric oxide, a potent vasodilator, is also released locally in several mammalian species during endometrial inflammation [27,28].

The low vascular resistance detected by Doppler ultrasonography in CEH-P versus CEH-C can be used to support the diagnosis of canine pyometra. In this study, no CEH-C bitch showed a RI below 0.72; thus, this threshold value could be used for the differential diagnosis between CEH-P and CEH-C. Further studies, including a larger number of animals, are still necessary to determine reference ranges as well as the prognosis value and the utility of Doppler for therapeutic elections. Furthermore, in women, Doppler ultrasound has been found to be a useful tool to evaluate medical treatment response [29]. The possibility to follow up the evolution of treated patients could improve the clinical outcome, avoiding unnecessary surgery and preserving the reproductive tract, in valuable bitches.



**Fig. 3.** Resistance index (mean  $\pm$  SEM) of the dogs of Figure 1. Different letters indicate differences ( $P < 0.01$ ) among groups.



It is concluded that the uterine artery blood flow of bitches suffering from pyometra was higher, not only from normal bitches but also from females with endometrial hyperplasia. Furthermore, endometrial hyperplasia, accompanied or not by luminal contents, has a higher blood flow than normal uterus. Hemodynamic parameters appear as useful markers to differentiate canine uterine pathologic conditions.

## Acknowledgments

This study was partially funded by the University Incentive Program of Teaching and Research V233. The authors are Career Scientists (CG and PGB) and Research Fellow (PRB) of the National Research Council (CONICET) of Argentina.

## References

- [1] Pretzer S. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: a review. *Theriogenology* 2008;70:359–63.
- [2] Dow C. The cystic endometrial hyperplasia–pyometra complex in the bitch. *Vet Rec* 1958;70:1102–8.
- [3] Schlafer D, Gifford A. Cystic endometrial hyperplasia, pseudo-placental endometrial hyperplasia, and other cystic conditions of the canine and feline uterus. *Theriogenology* 2008;70:349–58.
- [4] Hagman R. Clinical and molecular characteristics of pyometra in female dogs. *Reprod Domest Anim* 2012;47:323–5.
- [5] Schlafer D. Diseases of the canine uterus. *Reprod Domest Anim* 2012;47:318–22.
- [6] Wilborn RR, Maxwell HS. Clinical approaches to infertility in the bitch. *Vet Clin Small Anim* 2012;42:457–68.
- [7] England G, Yeager A, Concannon PW. Ultrasound imaging of the reproductive tract of the bitch. In: Concannon PW, Verstegen J, England G, editors. *Recent Advances in Small animal Reproduction*. Ithaca, NY: IVIS. Document A1226.0303, <http://www.ivis.org>; 2003 [Accessed 21.07.2003].
- [8] Bigliardi E, Prmigliani E, Cavirani S, Luppi A, Bonati L, Corradi A. Ultrasonography and cystic hyperplasia–pyometra complex in the bitch. *Reprod Domest Anim* 2004;39:136–40.
- [9] Davidson AP, Baker TW. Reproductive ultrasound of the bitch and queen. *Top Companion Anim Med* 2009;24:55–63.
- [10] Nyland TG, Mattoon JS. Ovaries and uterus. In: Nyland TG, Mattoon JS, editors. *Small animal diagnostic ultrasound*. Second edition. Philadelphia: WB Saunders; 2002. p. 231–49.
- [11] Fielder FD, Baker RF. Diagnostic applications of Doppler ultrasound. *Ultrasonics* 1969;7:36–8.
- [12] Özbay K, Deveci S. Relationships between transvaginal colour Doppler findings, infectious parameters and visual analogue scale scores in patients with mild acute pelvic inflammatory disease. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;156:105–8.
- [13] Emoto M, Tamura R, Shirota K, Hachisuga T, Kawarabayashi T. Clinical usefulness of color Doppler ultrasound in patients with endometrial hiperplasia and carcinoma. *Cancer* 2002;94:700–6.
- [14] Heppelmann M, Weinert M, Brömmling A, Piechotta M, Hoedemaker M, Bollwein H. The effect of puerperal uterine disease on uterine involution in cows assessed by Doppler sonography of the uterine arteries. *Anim Reprod Sci* 2013;143:1–7.
- [15] Freeman SL, Russo M, England GC. Uterine artery blood flow characteristics assessed during oestrus and the early luteal phase of pregnant and non-pregnant bitches. *Vet J* 2013;197:205–10.
- [16] Blanco PG, Tórtora M, Rodríguez R, Arias D, Gobello C. Ultrasonographic assessment of maternal cardiac function and peripheral circulation during normal gestation in dogs. *Vet J* 2011;190:154–9.
- [17] Batista PR, Gobello C, Corrada Y, Pons E, Arias DO, Blanco PG. Doppler ultrasonographic assessment of uterine arteries during normal canine puerperium. *Anim Reprod Sci* 2013;141:172–6.
- [18] Smith FO. Canine pyometra. *Theriogenology* 2006;66:610–2.
- [19] Mateus L, Eilts BE. Cystic endometrial hyperplasia and pyometra. In: Ettinger SJ, Feldman EC, editors. *Textbook of veterinary Internal Medicine*. Seventh edition. Philadelphia: WB Saunders; 2010. p. 1913–20.
- [20] Alvarez-Clau A, Liste F. Ultrasonographic characterization of the uterine artery in the nonestrus bitch. *Ultrasound Med Biol* 2005;33:583–7.
- [21] Köster K, Poulsen Nautrup C, Günzel-Apel AR. A Doppler ultrasonographic study of cyclic changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch. *Reproduction* 2001;122:453–61.
- [22] Alataş C, Aksoy E, Akarsu C, Yakin K, Bahçeci M. Hemodynamic assessment in pelvic inflammatory disease by transvaginal color Doppler ultrasonography. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;70:75–8.
- [23] Veiga GAL, Angrimani DRS, Szulciewiczski CR, Celeghini ECC, Papa PC, Vannucchi CI. Uterine Doppler velocimetry in bitches with cystic endometrial hyperplasia – pyometra. In: *Proceedings of the 7th International Symposium on canine and Feline Reproduction*. Canada: Whistler.
- [24] England GCW, Moxon R, Freeman SL. Delayed uterine fluid clearance and reduced uterine perfusion in bitches with endometrial hyperplasia and clinical management with postmating antibiotic. *Theriogenology* 2012;78:1611–7.
- [25] Heap RB, Poyster NL. Prostaglandins in pyometrial fluid from the cow, bitch ad ferret. *Br J Pharmacol* 1975;55:515–8.
- [26] Still JG, Greiss Jr FC. The effect of prostaglandins and other vasoactive substances on uterine blood flow and myometrial activity. *Am J Obstet Gynecol* 1978;130:1–8.
- [27] Rosselli M, Keller PJ, Rubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update* 1998;4:3–24.
- [28] Fang L, Nowicki BJ, Dong YL, Yallampalli C. Localized increase in nitric oxide production and the expression on nitric oxide synthase isoforms in rat uterus with experimental intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:601–9.
- [29] Tinkanen H, Kujansuu E. Doppler ultrasound findings in tubo-ovarian infectious complex. *J Clin Ultrasound* 1993;21:175–8.