

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

STEPHANIE FERNANDEZ

**Padronização dos métodos ultrassonográficos elastografia *strain* e
contraste de microbolhas em órgãos abdominais do tamanduá bandeira
(*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758)**

Pirassununga

2022

STEPHANIE FERNANDEZ

**Padronização dos métodos ultrassonográficos elastografia *strain* e
contraste de microbolhas em órgãos abdominais do tamanduá bandeira
(*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758)**

“Versão corrigida”

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor pelo Programa de pós-graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Luciano Andrade Silva

Orientadora *in memoriam*: Prof.^a Dra. Maria Cristina Ferrarini Nunes Soares Hage

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Cibele Figueira Carvalho

Pirassununga

2022

FICHA CATALOGRAFICA

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação,
FZEA/USP, com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

Fernandez, Stephanie

F363p Padronização dos métodos ultrassonográficos
elastografia strain e contraste de microbolhas em
órgãos abdominais do tamanduá bandeira
(Myrmecophagatri / Stephanie Fernandez;
orientador Luciano Andrade Silva; coorientadora
Cibele Figueira Carvalho. -- Pirassununga, 2022.
85 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

STEPHANIE FERNANDEZ

**Padronização dos métodos ultrassonográficos elastografia *strain* e
contraste de microbolhas em órgãos abdominais do tamanduá bandeira
(*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758)**

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor pelo Programa de pós-graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Luciano Andrade Silva
Orientadora *in memoriam*: Prof.^a Dra. Maria Cristina Ferrarini Nunes Soares Hage
Co-orientadora: Prof.^a Dra. Cibele Figueira Carvalho

Data de aprovação: __ / __ / _____

Banca examinadora:

*Dr. Luciano Andrade Silva
FZEA USP*

*Dr. Robson Fortes Giglio
University of Georgia*

*Dr. André Luiz Baptista Galvão
Universidade Federal de Roraima - UFRR*

*Dr^a Cibely Galvani Sarto
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC*

*Dr^a Tatiana Morosini de Andrade Cruvinel
Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP*

Pirassununga

2022

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

Protocolo CEUA-UNIRP nº 09/ 2019 PP

Certificamos que o projeto intitulado "Pradonização dos métodos ultrassonográficos elastografias Strain e Contraste de microbolhas em órgãos abdominais do tamandá-bandeira", protocolo nº "09/2019 PP" sob a responsabilidade de "Stephanie Fernandez" – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – "Projeto de Pesquisa" encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA UNIRP) do CENTRO UNIVERSITÁRIO DE RIO PRETO, em reunião de "09/10/2019"

Vigência do Projeto	01/11/19 a 12/09/20
Espécie/Linhagem	Canina/ -I
Nº de animais	20
Peso/Idade	- / -
Sexo	Masculino e feminino
Origem	Zoo Botânico de São José do Rio Preto e animais vindo do 4º Batalhão de Polícia Ambiental de Rio Preto vítimas de atropelamentos.

ATENÇÃO: Ao término da execução do projeto de pesquisa/aula o pesquisador responsável/orientador deverá encaminhar o relatório final à CEUA (Prazo para envio: 30 dias após o término previsto), juntamente com o Termo de Consentimento preenchido pelo proprietário.

São José do Rio Preto, 09 de outubro de 2019



Karina Ferreira de Castro
Coordenadora da CEUA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA

Pirassununga, 22 de setembro de 2020
CEUA N 7298310120

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Luciano Andrade Silva
Área: Medicina Veterinária

Título da proposta: "PADRONIZAÇÃO DOS MÉTODOS ULTRASSONOGRÁFICOS ELASTOGRAFIA STRAIN E CONTRASTE DE MICROBOLHAS EM ÓRGÃOS ABDOMINAIS DO TAMANDUÁ BANDEIRA (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758).".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FZEA (ID 001449)

O tamanduá bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758) está entre as espécies selvagens vítimas de trauma automobilístico e queimadas, o que a torna vulnerável à extinção. Logo, estudos de caráter científico buscam a preservação e a contribuição no diagnóstico e na terapêutica para esses animais. Este último constrói o principal objetivo deste trabalho, visando padronizar e descrever as técnicas ultrassonográficas de sonoelastografia e contraste por microbolhas em machos e fêmeas de tamanduá-bandeira. O grupo 1 será composto por 10 tamanduás bandeiras, adultos saudáveis, provenientes do Setor de Atendimento Clínico-cirúrgico de Animais Selvagens do Hospital Veterinário [Dr. Halim Atique] do Centro Universitário de Rio Preto [UNIRP] e do Zoológico Municipal de São José do Rio Preto-SP. Os grupos 2 e 3 (grupos controle) serão formados por cinco cães cada, saudáveis, adultos, entre machos e fêmeas, a partir de 25Kg de peso vivo, obtidos da rotina do Setor de Atendimento Clínico-cirúrgico de Pequenos Animais do Hospital Veterinário [Dr. Halim Atique] do Centro Universitário de Rio Preto [UNIRP] e de cães parcelos. No grupo 2 será realizado o protocolo de contenção química do grupo 1 e o grupo 3 não receberá contenção química. Todos os animais serão submetidos à avaliação hematológica, bioquímicas, urinálise e coproparasitológico para caracterização da saúde. Posteriormente, proceder-se-á ao exame ultrassonográfico utilizando o aparelho ACUSON NX3 ELITE/SIEMENS, ao modo-B, com transdutores multifrequenciais e matriciais convexo, microconvexo e linear, para varredura geral da cavidade abdominal. Em seguida o fígado, baço e os rins dos animais serão avaliados com o software de sonoelastografia, onde serão formadas imagens em tons de cinza e em um mapa de cores (tons de vermelho, verde e azul) do tecido hepático, esplênico e renal, para avaliação da dureza tecidual relativa (elastograma). Após este estudo, o fígado será avaliado com contraste por microbolhas, hexafluoreto de enxofre (SonoVue®), através de software específico verificando a presença ou ausência de microbolhas, os tempos de wash-in, wash-out e tempo de pico de contraste, além de proceder a classificação do realce e do padrão de preenchimento. Tem-se por objetivo avaliar se as técnicas descritas na espécie canina podem ser aplicadas numa espécie selvagem, visando contribuir com parâmetros de normalidade para o tamanduá-bandeira. Espera-se determinar o padrão de normalidade elastográfico do fígado, baço e dos rins, assim como do contraste por microbolhas do fígado e estabelecer uma correlação destas técnicas com a espécie canina.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP, na reunião de 25/03/2020, **ANALISOU** a proposta em questão, e decidiu por **ARQUIVAR** todo o processo.

Comentário da CEUA: Esta CEUA FZEA RETIRA o pedido do projeto do sistema, visto que o mesmo já tem uma aprovação CEUA-UNIRP nº 09/2019 PP do Centro Universitário de Rio Preto, onde também ocorrerá o projeto de pesquisa. Sendo assim, não há necessidade de envio para aprovação da CEUA FZEA.

Prof. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Prof. Dra. Daniele dos Santos Martins
Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70260-1	Data da Emissão: 12/09/2019 20:25:49	Data da Revalidação*: 12/09/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Stephanie Fernandez	CPF: 368.840.778-40
Título do Projeto: Padronização dos métodos ultrassonográficos elastografia strain e contraste de microbolhas em órgãos abdominais do tamandua bandeira (<i>Mymecophaga tridactyla</i> , Linnaeus, 1758)	
Nome da Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos	CNPJ: 63.025.530/0097-56

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	coleta de amostras e ultrassonográfico	10/2019	10/2021

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Tatiana Morosini de Andrade Cruvinel	Anestesia, Monitoramento e coleta de amostras	167.863.208-21	Brasileira
2	SAMUEL VILLANOVA VIEIRA	Contenção física, transporte	361.362.668-30	Brasileira

Observações e ressalvas

1	Esta autorização NÃO isenta o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador da área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade e fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação de legislação vigente, ou quando de inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante declínio motivado, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0702600120190912

Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70260-1	Data da Emissão: 12/09/2019 20:25:49	Data da Revalidação*: 12/09/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Stephanie Fernandez	CPF: 368.840.778-40
Título do Projeto: Padronização dos métodos ultrassonográficos elastografia strain e contraste de microbolhas em órgãos abdominais do tamandua bandeira (<i>Myrmecophaga tridactyla</i> , Linnaeus, 1758)	
Nome da Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos	CNPJ: 63.025.530/0097-56

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Hospital Veterinário "Dr. Halim Atique" e Zoológico Municipal de São José do Rio Preto	São José do Rio Preto-SP	Cerrado	Não	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	-

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Xenarthra)	Sangue, Urina, Fezes

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Hospital Veterinário "Dr. Halim Atique"	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0702600120190912

Página 2/3



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70260-1	Data da Emissão: 12/09/2019 20:25:49	Data da Revalidação*: 12/09/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Stephanie Fernandez	CPF: 368.840.778-40
Título do Projeto: Padronização dos métodos ultrassonográficos elastografia strain e contraste de microbolhas em órgãos abdominais do tamandú bandeira (<i>Myrmecophaga tridactyla</i> , Linnaeus, 1758)	
Nome da Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos	CNPJ: 63.025.530/0097-56

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0702600120190912

Para Aqueles que sempre estiveram e estarão ao meu lado, me sustentando a todo o momento, sem os quais não chegaria até aqui, DEUS, JESUS e ESPÍRITO SANTO, dedico.

Para aquela que sempre com sua fé me ergueu nos momentos mais difíceis da
minha vida e me proibiu de pensar em desistir, MÃE, dedico.

Para aquele que foi parceiro nas viagens e encarou os desafios dessa jornada,
PAI, dedico.

Para aquela que foi minha fiel parceira de estudos, VITÓRIA *in memoriam*,
dedico.

Para aquela que acreditou em mim, dando-me seu voto de confiança, com um sorriso largo, Prof.^a Dra. Maria Cristina Ferrarini Nunes Soares Hage *in memoriam*, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, Jesus e ao Espírito Santo pela sabedoria, por guiarem meus passos e por me sustentarem a todo o instante.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luciano Andrade Silva, por toda sua ajuda, suporte e compreensão inestimáveis para a realização deste projeto.

À minha co-orientadora Prof^a Dra. Cibele Figueira Carvalho pelos seus conhecimentos e contribuições valiosas para a realização deste projeto.

À minha professora de graduação, colega de trabalho, amiga e parceira desta jornada, Prof^a Dra. Tatiana Morosini de Andrade Cruvinel.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, às secretárias Kefilin, Paula, Cecília e Érica pela ajuda e atenção prestados

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código Financeiro 0001 pelo apoio.

Ao Zoológico Municipal de São José do Rio Preto-SP, pela permissão para utilizar os animais do plantel, e aos médicos veterinários Dr. Ciro Alexandre Teixeira Cruvinel, Dr. Bernhard von Schimonsky, ao biólogo Samuel Villanova Vilela, funcionários do Zoológico, aprimorandos Cláudio Brito e Milena Martins Carvalho Rosa, e estagiários pela ajuda prestada.

Ao Hospital Veterinário Dr. Halim Atique pela infraestrutura oferecida para a realização dessa pesquisa e ao Diretor do Hospital Veterinário Dr. Halim Atique, Prof. Halim Atique Netto, pelo apoio e incentivo.

Ao tecnólogo em radiologia Matheus Henrique Zampieri e a técnica em radiologia Jéssica Moraes Tolentino pela ajuda na realização dos exames de imagem.

*“Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum,
porque Tu estás comigo; tua vara e o teu cajado me consolam”*

Salmo 23, 4.

RESUMO

FERNANDEZ, S. **Padronização dos métodos ultrassonográficos elastografia *strain* e contraste de microbolhas em órgãos abdominais do tamanduá bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758).** 2022. 85f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

O tamanduá bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758) é um animal de grande porte, que faz parte da cadeia alimentar do ambiente em que vive, ajudando no controle de insetos e servindo como alimento para outros animais. Está entre as espécies selvagens vítimas de traumas e queimadas, o que a torna vulnerável à extinção. Logo, estudos científicos buscam a preservação e a contribuição no diagnóstico e na terapêutica desses animais. Contribuir na área de diagnóstico é o principal objetivo deste trabalho, visando padronizar e descrever as técnicas de sonoelastografia e contraste por microbolhas no tamanduá bandeira. O estudo foi realizado com três grupos experimentais, sendo o grupo 1 composto por 10 tamanduás bandeiras, adultos saudáveis, provenientes do Zoológico Municipal de São José do Rio Preto-SP e os grupos 2 e 3 compostos por cinco cães cada, saudáveis, adultos, entre machos e fêmeas, a partir de 25 Kg de peso vivo, obtidos da rotina do Setor de Atendimento Clínico-cirúrgico de Pequenos Animais do Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique” do Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP. O grupo 2 recebeu o mesmo protocolo de contenção química do grupo 1 e o grupo 3 não passou por contenção química. Todos os animais foram submetidos à avaliação hematológica, bioquímicas, urinálise e coproparasitológico para caracterização da saúde. Somente animais hígidos foram utilizados. Exame ultrassonográfico ao modo-B foi realizado com o aparelho ACUSON NX3 ELITE/SIEMENS, com transdutores multifrequenciais e matriciais convexo (2.0 a 5.0 MHz), microconvexo (3.1 a 8.8 MHz) e linear (4.0 a 12.0 MHz), para varredura geral da cavidade abdominal. Em seguida o fígado, baço e os rins foram avaliados com o *software* de sonoelastografia, sendo formadas imagens em mapa de cores (tons de vermelho, verde e azul) do tecido hepático, esplênico e renal, para avaliação da dureza tecidual relativa (elastograma). Após este estudo, o fígado foi avaliado com contraste por microbolhas, hexafluoreto de enxofre (SonoVue®), através de *software* específico, verificando a presença ou ausência de microbolhas, os tempos defase arterial, *wash-in*, *wash-out* e tempo de pico de contraste. Na sonoelastografia, foi observado o fígado com deformidade heterogênea, o baço predominantemente não deformável e os rins com cortical e medular não deformáveis. Na avaliação com contraste por microbolhas, foi observada a fase arterial entre os cães anestesiados e conscientes semelhantes, exceto quando comparados com os tamanduás, que foi menor ($P<0.05$). O tempo de *wash-in* foi diferente para os tamanduás quando comparado aos cães anestesiados, sendo maior ($P<0.05$) No pico de contraste houve diferença entre os cães e tamanduás, que foi maior ($P<0.05$) e o tempo de *wash-out* foi maior nos cães anestesiados quando comparados aos não anestesiados. As técnicas de sonoelastografia e de contraste por microbolhas descritas em cães foram aplicadas com êxito no tamanduá bandeira, auxiliando na determinação do padrão de normalidade dos

órgãos estudados, sendo ferramentas auxiliadoras na avaliação ultrassonográfica nesta espécie.

Palavras-chave: tamanduá bandeira, ultrassonografia, elastografia strain, microbolhas, cães.

ABSTRACT

FERNANDEZ, S. **Standardization of ultrasonographic methods strain elastography and microbubble contrast in abdominal organs of the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758)**. 2022. 85f. Doctoral thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

The giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758) is a large animal and is part of the food chain of the environment in which it lives, helping to control insects and serving as food for other animals. Is among the wild species trauma and fires victims, which makes it vulnerable to extinction. Therefore, scientific studies seek to preserve and contribute to the diagnosis and therapy of these animals. Contributing to the diagnosis is the main objective of this study, aiming to standardize and describe sonoelastography and microbubble contrast techniques in the giant anteater. The study was performed with three experimental groups, being group 1 consisted of 10 anteaters, healthy adults, from the Municipal Zoo of São José do Rio Preto-SP and groups 2 and 3 were formed by five dogs each, healthy, adults, between males and females, from 25 kg of live weight, obtained from the routine of the Clinical-Surgical Care Sector of Small Animals of the Veterinary Hospital “Dr. Halim Atique” from the University Center of Rio Preto – UNIRP. The group 2 received the same chemical containment protocol as group 1 and the group 3 didn't receive chemical containment. All animals were submitted to hematological, biochemical, urinalysis and coproparasitological evaluation for health assessment. Only healthy animals were used in this study. Ultrasound examination was performed with the ACUSON NX3 ELITE/SIEMENS device, in B-mode, with multifrequency transducers and convex (2.0 to 5.0 MHz), microconvex (3.1 to 8.8 MHz) and linear (4.0 to 12.0 MHz) arrays, for general scanning of the abdominal cavity. Then, the liver, spleen and kidneys were evaluated with the sonoelastography software and images were formed in color map (shades of red, green and blue) of the hepatic, splenic and renal tissue, to evaluate the hardness relative tissue (elastogram). After this study, the liver was evaluated with microbubble contrast, sulfur hexafluoride (SonoVue®), using specific software, verifying the presence or absence of microbubbles, wash-in and wash-out times and peak contrast time. In sonoelastography, was observed the liver with heterogeneous deformity, spleen predominantly non-deformable and the kidneys with cortical and medullary non-deformable. In the evaluation of microbubble contrast, was observed the arterial phase between anesthetized and conscious dogs was similar, except when compared with the anteaters was smaller ($P<0.05$). The vascular filling of the hepatic parenchyma (wash-in) was different for anteaters when compared to anesthetized dogs was higher ($P<0.05$). The peak contrast there was a difference between dogs and anteaters, that was higher ($P<0.05$) and the wash-out time was higher in the anesthetized dog when compared with conscious dogs. The sonoelastography and microbubble contrast technique described in dogs was successfully applied to the giant anteater, assisting in the determination of the standard normality of organs studied, being auxiliary tools in the ultrasound evaluation in this species.

Keywords: giant anteater, ultrasonography, strain elastography, microbubbles, dogs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	B-mode image of the liver and gallbladder of the giant anteater (A) and the dog (B).....	49
Figura 2 -	B-mode image of the spleen of the giant anteater (A) and the dog (B).....	50
Figura 3 -	B-mode image of the kidney of the giant anteater (A) and the dog (B). Noted small free fluid near kidney of the anteater.....	50
Figura 4 -	Hepatic sonoelastography of the giant anteater (A) and the dog (B).....	51
Figura 5 -	Splenic sonoelastography of the giant anteater (A) and the dog (B).....	52
Figura 6 -	Renal sonoelastography of the giant anteater (A) and the dog (B).....	52
Figura 7 -	Giant anteater – Filling of the hepatic parenchyma by contrast agent (wash-in).....	66
Figura 8 -	Anesthetized dog – Filling of the hepatic parenchyma by contrast agent (wash-in).....	66
Figura 9 -	Non-anesthetized dog – Filling of the hepatic parenchyma by contrast agent (wash-in).....	67
Figura 10 -	Giant anteater – Arterial phase after contrast agent administration.....	67
Figura 11 -	Anesthetized dog – Arterial phase after contrast agent administration.....	68
Figura 12 -	Non-anesthetized dog – Arterial phase after contrast agent administration.....	68
Figura 13 -	Giant anteater – Peak contrast of hepatic parenchyma after contrast agent administration.....	69
Figura 14 -	Anesthetized dog – Peak contrast of hepatic parenchyma after contrast agent administration.....	69
Figura 15 -	Non-anesthetized dog – Peak contrast of hepatic parenchyma after contrast agent administration.....	70
Figura 16 -	Giant anteater – Exit of contrast agent from the hepatic	

	parenchyma (wash-out).....	70
Figura 17 - Anesthetized dog – Exit of contrast agent from the hepatic	parenchyma (wash-out).....	71
Figura 18 - Non-anesthetized dog – Exit of contrast agent from the hepatic	parenchyma (wash-out).....	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Descrição ultrassonográfica dos principais órgãos abdominais tamanduá bandeira.....	30
--	----

LISTA DE TABELAS

Table 1 -	Time variables of arterial phase, wash-in, peak contrast and hepatic wash-out of the evaluated groups.....	72
-----------	--	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	26
CAPÍTULO 2. REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1 ANATOMIA TOPOGRAFIA DA CAVIDADE ABDOMINAL DO TAMANDUÁ BANDEIRA.....	28
2.2 ULTRASSONOGRRAFIA MODO-B DA CAVIDADE ABDOMINAL DO TAMANDUÁ BANDEIRA	29
2.3 CONTRASTE MICROBOLHAS	31
2.4 ELASTOGRAFIA.....	33
REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	43
3.1 GERAL	43
3.2 ESPECÍFICOS.....	43
CAPÍTULO 4. HIPÓTESES	44
CAPÍTULO 5 – B-MODE ULTRASONOGRAPHY AND STRAIN ELASTOGRAPHY IN LIVER, SPLEEN AND KIDNEYS OF THE DOG (<i>Canis lupus familiaris</i>, Linnaeus, 1758) AND GIANT ANTEATER (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>, Linnaeus, 1758)	45
5.1 ABSTRACT	45
5.2 INTRODUCTION.....	45
5.3 MATERIAIS AND METHODS	47
5.4 RESULTS	49
5.5 DISCUSSION.....	53
5.6 CONCLUSION	56
REFERENCES	57
CAPÍTULO 6 – ULTRASOUND OF THE LIVER USING A MICROBUBBLE CONTRAST AGENT IN GIANT ANTEATER (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>, Linnaeus, 1758)	60
6.1 ABSTRACT	60
6.2 INTRODUCTION.....	61
6.3 MATERIAIS AND METHODS	63
6.4 RESULTS	65
6.5 DISCUSSION.....	72

6.6 CONCLUSION.....	74
REFERENCES	75
CAPÍTULO 7. CONCLUSÃO.....	79
APÊNDICE A – Local de execução.....	80
APÊNDICE B – Contenção dos animais e transporte.....	81
APÊNCIDE C – Coleta de amostras biológicas.....	84
APÊNDICE D – Análise laboratorial.....	85

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Pertencente ao filo Chordata, classe Mammalia, ordem Pilosa e família Mymecophagidae, o tamanduá bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758) apresenta grande porte e se alimenta de insetos, o que ajuda no controle da população desses insetos, além de fazer parte da cadeia alimentar do ambiente com que vive, servindo de alimento para outros animais, contribuindo para o equilíbrio do ecossistema (BERTASSONI, 2017).

Apresenta uma ampla distribuição geográfica pelo país, presente nos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Piauí, Rondônia, Roraima, São Paulo e Tocantins. Porém, nos últimos anos esta espécie é considerada vulnerável à extinção (MIRANDA et al., 2012), pois apresenta redução no número de indivíduos devido ao atropelamento em rodovias, queimadas, desmatamento para aumento das áreas destinadas à agricultura, pecuária e implementação de rodovias, além de serem alvos de práticas de caça e intoxicação por inseticidas utilizados no controle de pragas agrícolas (MIRANDA et al., 2012; LUNA; HOSSOTANI; MOREIRA, 2014).

Vítimas de traumas, principalmente automobilísticos em rodovias, os tamanduás representam cerca de 4,16% dos animais da fauna brasileira que são atropelados anualmente (DNIT, 2012). Os tamanduás resgatados pelos órgãos públicos são direcionados a unidades de apoio a atendimento de emergência, como universidades, zoológicos e centros de preservação ambiental. Portanto, uma avaliação clínica precisa se faz necessária para determinar o diagnóstico e a terapêutica adequada para esses animais.

Em se tratando de exames complementares, os exames de imagens são essenciais para avaliação de pacientes com histórico de traumas, como por exemplo o exame radiográfico, o qual já há descrição para esta espécie, e a ultrassonografia.

As pesquisas e publicações quanto a utilização da ultrassonografia envolvem, em sua maioria, relatos de casos e a padronização de técnicas como, por exemplo, a avaliação ultrassonográfica em modo-B (ALBUQUERQUE, 2017). No entanto, até o presente momento, não há dados

na literatura referentes à padronização e descrição da aplicação das técnicas ultrassonográficas avançadas como Doppler, contraste de microbolhas e sonoelastografia em tamanduás bandeira.

Por se tratar de técnicas ultrassonográficas aplicadas na medicina veterinária de animais de companhia e capazes de fornecer dados importantes que contribuem para o diagnóstico de algumas afecções, tal estudo torna-se importante, uma vez que auxiliará na padronização dos aspectos de normalidade para o tamanduá bandeira, além de fornecer dados para estudos futuros nesta e em outras espécies de animais selvagens. O uso da sonoelastografia e do contraste por microbolhas podem auxiliar no diagnóstico e prognóstico de situações emergenciais, como também em casos de medicina interna nos resgates efetuados nesta espécie em risco de extinção.

O presente estudo teve por objetivo padronizar e descrever as técnicas ultrassonográficas de sonoelastografia e contraste por microbolhas em machos e fêmeas de tamanduá bandeira saudáveis.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANATOMIA TOPOGRÁFICA DA CAVIDADE ABDOMINAL DO TAMANDUÁ BANDEIRA

No tamanduá bandeira, o fígado se encontra na porção cranial e oblíqua à superfície abdominal do diafragma, caudal ao ventrículo gástrico, apresentando relações anatômicas com o ventrículo gástrico por intermédio do ligamento coronário. Possui um aparato ligamentar composto pelos ligamentos redondo, falciforme e triangulares. Em relação à lobulação hepática, esta espécie não possui os processos caudado e papilar, sendo o lobo lateral direito único. Assim, os lóbulos estão divididos em lateral direito, medial direito, lateral esquerdo, medial esquerdo e quadrado. Ressalta-se que o lobo lateral direito é único na vista diafragmática. A vesícula biliar foi relatada nesta espécie, assim como a sistematização dos ductos biliares intra-hepáticos (KELER et al., 2017). O ducto *choledocus* não tem afluentes em todo o fígado e surge da união do ducto cístico com o ducto hepático. O ducto hepático resulta da junção do *ramus principalis dexter* e do *ramus principalis sinister* (MIGLINO et al, 1992).

O ventrículo gástrico está localizado entre o sexto e o décimo par de costelas, em formato de letra “J”. Sua face cranial (parietal) relaciona-se com o lobo hepático esquerdo e com a parede abdominal esquerda, enquanto a face caudal (visceral), com os intestinos (delgado e grosso), pâncreas e baço. O ventrículo gástrico se divide em região fúndica, corpo e pilórica (MENEZES, 2013). O baço está situado da região epigástrica esquerda até a região média, em direção ventral, aproximando-se à cicatriz umbilical, possuindo formato alongado (ALBUQUERQUE, 2017).

Quanto ao trato intestinal, o intestino delgado ocupa a maior parte da cavidade abdominal, sendo composto pelo duodeno, inserido pela prega peritoneal, e pelo jejuno e íleo, inseridos pelo mesentério. O intestino grosso se estende do final do íleo até o ânus, sendo formado pelo ceco, cólon ascendente, transversal e descendente, reto e ânus (MENEZES, 2013).

Já o pâncreas, está localizado medialmente ao duodeno em direção ao rim esquerdo. Possui uma única lobulação, ou seja, somente o lobo esquerdo.

É envolto por uma fina cápsula de tecido conectivo e aderido ao ventrículo gástrico. Apresenta a face gástrica, na qual dois terços do órgão acompanham a curvatura maior gástrica, com início craniodorsal e término caudoventral. Uma pequena parte justapõe-se ao segmento inicial do duodeno, em formato de letra “L”, a qual representa o lobo esquerdo. Quanto à face dorsolateral, esta se volta para a cavidade abdominal relacionando-se craniodorsalmente com o ventrículo gástrico e caudoventralmente com a cápsula fibrosa renal e intestinos (IGLESAS, 2014; IGLESAS et al., 2017).

As adrenais direita e esquerda estão localizadas na extremidade cranial dos rins, com o pâncreas, fígado e reto no antímero esquerdo e com o duodeno e jejuno no antímero direito. A adrenal direita apresenta formato alongado, enquanto a esquerda formato triangular. Quanto as mensurações médias, foram descritas para a adrenal direita $2,60 \pm 0,13$ cm de comprimento e $0,45 \pm 0,11$ cm de espessura, enquanto para a adrenal esquerda $2,37 \pm 0,12$ cm de comprimento e $0,68 \pm 0,14$ cm de espessura. Porém, tanto a morfologia como as dimensões das glândulas adrenais podem ser diferentes de acordo com o peso do animal (SANTOS et al., 2016).

Nas fêmeas, os ovários apresentam formato ovais, ligeiramente achatados, com dimensões aproximadas: comprimento 2,0 a 2,5 cm, largura de 0,7 a 1,0 cm e altura de 0,4 a 0,5 cm, e localizam-se caudais aos rins. O útero possui formato de pêra e achatado dorsoventralmente. O corpo uterino apresenta comprimento de 3 a 5 cm, largura de 2,5 a 3 cm e altura de 1,5 a 2 cm. Nos machos, os testículos estão localizados na cavidade abdominal caudal, mediocaudalmente aos rins, apresentando formato ovais, com comprimento de aproximadamente de 6,0 a 7,0 cm e largura de 3,0 a 4,0 cm (FROMME et al., 2021).

2.2 ULTRASSONOGRAFIA MODO-B DA CAVIDADE ABDOMINAL DO TAMANDUÁ BANDEIRA

A ultrassonografia modo-B é a modalidade ultrassonográfica mais difundida na medicina veterinária. No âmbito dos animais selvagens, em especial no que se refere à família Mymecophagidae, alguns estudos foram

publicados, como por exemplo a estimativa do crescimento fetal de *Tamandua tetradactyla* (tamanduá mirim) (THOMPSON et al., 2017); determinação de prenhez e estimativa da data de parto em tamanduá bandeira (NAPIER; NOFS; BOEDEKER, 2009); detecção de gastrite parasitária em tamanduá bandeira (COKE et al., 2002), dentre outros. No quadro abaixo (Quadro 01) segue a descrição ultrassonográfica dos principais órgãos abdominais avaliados na ultrassonografia modo-B do tamanduá bandeira.

Quadro 01 – Descrição ultrassonográfica dos principais órgãos abdominais do tamanduá bandeira.

Órgão	Características ultrassonográficas
Fígado	Contornos ou margens regulares, ecotextura homogênea e hipoecogênico em relação ao baço (LOPES et al., 2015).
Vesícula biliar	Formato arredondado ao corte transversal, preenchida por conteúdo anecogênico, homogêneo e as paredes finas hiperecogênicas (LOPES et al., 2015; ALBUQUERQUE, 2017).
Baço	Hiperecogênico em relação ao fígado e a cortical renal, ecotextura fina e homogênea, contornos regulares (LOPES et al., 2015; ALBUQUERQUE, 2017).
Ventrículo gástrico	Parede com aproximadamente 0,76 cm, pregas de mucosas definidas e piloro com formato cilíndrico (LOPES et al., 2015).
Trato gastrintestinal	Parede com padrão em cinco camadas com ecogenicidades alternadas: lúmen hiperecogênico; mucosa hipoecogênica; submucosa hiperecogênica; muscular hipoecogênica e serosa hiperecogênica (ALBUQUERQUE, 2017).
Rins	Contornos regulares, cápsula hiperecogênica, cortical hipoecogênica e homogênea, medular hipoecogênica em relação à cortical e a pelve renal hiperecogênica, sendo o rim direito cranial em relação ao esquerdo e não se encontra na fossa renal do lobo hepático direito (ALBUQUERQUE, 2017).
Vesícula urinária	Formato piriforme (LOPES et al., 2015) a arredondado, preenchida por conteúdo anecogênico e homogêneo. Parede composta por três linhas: camada muscular hiperecogênica, submucosa hiperecogênica e mucosa hipoecogênica, com espessura média de 0,23 cm (ALBUQUERQUE, 2017).
Testículos	Localizam-se no interior na cavidade abdominal dorsal à vesícula

	urinária (LOPES et al., 2015) e são estruturas hiperecogênicas, ovaladas, de ecotextura homogênea e com mediastino central hiperecogênico (ALBUQUERQUE, 2017).
Epidídimos	Arredondados ao corte transversal e hiperecogênicos em relação aos testículos (LOPES et al., 2015).
Útero	Estrutura tubular hiperecogênica e piriforme (ALBUQUERQUE, 2017).

2.3 CONTRASTE POR MICROBOLHAS

A ultrassonografia é uma modalidade de exame complementar não invasiva utilizada para avaliar o tamanho, formato, contorno, parênquima e a vascularização de vários órgãos. No entanto, a imagem ultrassonográfica possui pouco contraste devido às propriedades acústicas semelhantes dos tecidos moles. Quanto à vascularização, o modo Doppler fornece informações sobre o fluxo sanguíneo, porém não é capaz de promover a visibilização de pequenos vasos e capilares. Para tal, existe a possibilidade de aumentar a efetividade da ultrassonografia por meio de agentes de contrastes intravenosos constituídos de microbolhas de gás (WDOWIAK et al., 2010). Isso é possível devido a capacidade desses agentes em aumentar a refletividade do ultrassom na circulação sanguínea, aumentando a acurácia diagnóstica (PINTO, 2010).

A descoberta e subsequente desenvolvimento dos contrastes por microbolhas veio de uma observação realizada por um cardiologista, Dr. Charles Joiner, no final dos anos 1960. Ele, realizando o ecocardiograma modo-M, injetou por meio de um cateter localizado no ventrículo esquerdo a substância indocianina verde para mensurar o débito cardíaco, onde foi observado aumentos transitórios nos sinais ultrassonográficos do ventrículo após cada injeção. Pesquisas subsequentes mostraram que o aumento dos sinais ultrassonográficos foi causado por pequenas bolhas que se formaram na ponta do cateter (GRAMIAK, 1968).

Os contrastes por microbolhas podem ser classificados em primeira geração, os quais compreendem o uso do próprio ar como meio gasoso, como exemplo a administração intravenosa de solução cristalóide de cloreto de sódio

a 0,9% agitada. No entanto, esses contrastes possuem baixa longevidade e rápida difusão das bolhas gasosas (CALLIADA et al., 1998; MILLER; NANDA, 2004; WDOWIAK et al., 2010).

Posteriormente, descobriu-se que a albumina melhorava a qualidade e estabilidade das microbolhas, resultando no desenvolvimento do primeiro agente de contraste farmacêutico, o Alunex™ (WDOWIAK et al., 2010). Outro exemplo de contraste de primeira geração é o Levovist® (CALLIADA et al., 1998; PINTO, 2010). Além da albumina, outros compostos são capazes de estabilizar as microbolhas, como fosfolipídios, mais especificamente surfactantes, que reduzem sua difusão, aumentando seu tempo de permanência na circulação e sua capacidade de lidar com variações de pressão (MILLER; NANDA, 2004)

Os agentes de contraste por microbolhas de segunda geração são constituídos por gases fluorcarbonados, hexafluoreto de perfluorocarbono ou enxofre, sendo eles de alto peso molecular, por consequência possuem menor solubilidade e maior capacidade de difusão, conferindo maior estabilidade às microbolhas e maior persistência na circulação (CALLIADA et al., 1998; CORREAS et al., 2001). Como exemplos de contrastes por microbolhas de segunda geração tem-se o SonoVue®, Optison®, Definity® e PESDA (CALLIADA et al., 1998; PINTO, 2010). Já os agentes de contraste por microbolhas de terceira geração são compostos por microbolhas com dimensões menores que os de segunda geração e constituídos de gás perfluorbutano, permanecendo mais tempo na circulação. Como exemplo cita-se o BR14 da Bracco (FISHER et al., 2002).

A utilização desta técnica na medicina veterinária é recente e descrita em pequenos animais, como por exemplo, na avaliação hepática em cães (NYMAN et al., 2005; WDOWIAK et al., 2010); na distinção de lesões benignas e malignas hepáticas baseada em padrões de perfusão em cães (O'BRIEN et al., 2004) e em ratos (CARVALHO et al., 2013); na avaliação esplênica de cães saudáveis (OHLERTH et al., 2007; NAKAMURA et al., 2009), cães portadores de lesões nodulares esplênicas (OHLERTH et al., 2008; NAKAMURA et al., 2010), e em cães submetidos à sedação (ROSSI et al., 2016); na ecocardiografia para avaliação da perfusão no diagnóstico de infarto cardíaco

em cães (DAR et al., 2009); estudos da perfusão renal de cães saudáveis e anestesiados (CHOI et al., 2016); avaliação de carcinoma de células de transição em vesícula urinária em cão (MACRÌ et al., 2018) e na avaliação dos órgãos da cavidade abdominal em felinos (LEINONEN, 2011).

Lin et al. (2013) realizaram ultrassonografia contrastada por microbolhas em cães com lesões esplênicas traumáticas iatrogênicas a fim de determinar o comportamento das lesões. Notou-se que havia um defeito de perfusão e ausência de realce da área lesionada do parênquima esplênico e nos casos de hemorragia ativa traumática, houve extravasamento do contraste na região lesionada. Observou-se alteração na perfusão sanguínea e interrupção do realce arterial em casos de sangramento ativo. Para os autores, esta técnica é capaz de monitorar em tempo real o trauma esplênico e a detecção de sangramento.

No geral, a ultrassonografia com contraste por microbolhas fornece informações da perfusão de um órgão ou lesão, que pode ser útil para a categorização de lesões e para determinação de locais para procedimentos de biópsia. Além disso, podem ter aplicações terapêuticas (UNGER et al., 2002), pois quando ligados a genes ou fármacos podem ser direcionados e incorporados nas esferas de microbolhas para diagnóstico específico e funções terapêuticas. Como os agentes são encapsulados em bolhas, os efeitos tóxicos sistêmicos são minimizados (FERRARA; POLLARD; BORDEN, 2007). A deposição de energia localizada associada à destruição de bolhas também pode ser usada para a dissolução de coágulo (DAR et al., 2009).

As pesquisas veterinárias foram realizadas em pequenos animais, no entanto, não há dados publicados quanto a padronização e a aplicação desta técnica em animais selvagens.

2.4 ELASTOGRAFIA

As propriedades mecânicas dos tecidos dependem da sua constituição, como por exemplo a quantidade de água, de fibras colágenas, elastina, gordura, e de sua disposição para a organização tecidual. Logo, a resposta de

um tecido frente a uma força no qual é submetido depende da sua mobilidade, elasticidade e dureza (CARVALHO; CHAMAS, 2013).

Nas diferentes doenças, os tecidos sofrem alterações estruturais, que geralmente tornam-no mais rígido e é esperado que ocorra uma alteração na capacidade de interação acústica, quando submetidos à ultrassonografia em modo B, permitindo realizar o diagnóstico. No entanto, pode acontecer de não apresentarem alterações de ecogenicidade e ecotextura, não sendo possível correlacionar esses aspectos com a elasticidade ou rigidez tecidual (CARVALHO; CHAMAS, 2013). A técnica de elastografia é relativamente nova e propicia uma avaliação da elasticidade/rigidez dos tecidos, quando comparada a outras técnicas (CARVALHO et al., 2013; TRINDADE, 2013).

A elasticidade pode ser definida como a habilidade de um tecido ou material em readquirir seu formato e tamanho original, após a aplicação de uma força ou estresse mecânico. A deformação tecidual ou elasticidade é inversamente proporcional à rigidez e entre os tipos teciduais, devido suas diferentes composições (SLAPA, 2011; HOLDSWORTH et al., 2014). Existem dois tipos de elastografia: (1) a qualitativa, dada pela sonoelastografia *strain* (de tensão), na qual o tecido é submetido a uma força mecânica (ondas de compressão manual) e o sistema de imagem mede a resposta do tecido a essa força, e (2) a quantitativa, pela *shear wave elastography*, por meio de emissão de ondas de cisalhamento (CARVALHO; CHAMAS, 2013).

Na sonoelastografia, os tecidos mais rígidos deformam-se menos mediante uma compressão, diferentemente daqueles com maior susceptibilidade à compressão, demonstrando maior deformação. Essa deformidade é representada em uma escala de cinza, onde as áreas mais claras correspondem a tecidos mais elásticos ou macios, enquanto as mais escuras, a tecidos menos elásticos ou duros. Também pode ser representada em uma escala de cores, sendo o vermelho representa tecidos mais elásticos/macios, o verde, tecidos com deformidade intermediária e o azul, com menor elasticidade ou maior dureza (CARVALHO; CHAMAS, 2013).

Já na elastografia quantitativa, uma força de radiação acústica (*acoustic radiation force impulse* – ARFI) ou onda de cisalhamento é aplicada na região de interesse, sendo capaz de levar ao deslocamento tecidual, não precisando

proceder à compressão manual (FRIZZELL; CARSTENSEN, 1976; MADSEN; SATHOFF; ZAGZEBSKI, 1983; CARVALHO; CHAMAS, 2013). Ao registrar a onda de cisalhamento em vários locais e correlacionar essas medições com o tempo decorrido, a velocidade da onda de cisalhamento (metros/segundo) pode ser quantificada. Logo, quanto mais denso o tecido, maior será a velocidade da onda de cisalhamento, à medida que esta atravessa o tecido (MAULDIN et al., 2008; ZHAI et al., 2008; LUPSOR et al., 2009).

Na medicina veterinária, há relatos da aplicação da sonoelastografia em próstata e testículos de cães para padronização da técnica (MANTZIARAS; LUVONI, 2016), em algumas afecções prostáticas, como neoplasias prostáticas em cão (DOMOSŁAWSKA et al., 2018), e em afecções testiculares em ratos (HEREK et al., 2016).

White et al. (2013) avaliaram o fígado, baço e rins em dez felinos adultos (1,4 anos) saudáveis pela elastografia por compressão. O parênquima hepático apresentou menor rigidez em comparação com a parede abdominal adjacente. Quanto ao baço, notou-se que o parênquima esplênico possuía menor rigidez do que a parede abdominal e maior rigidez do que a gordura abdominal adjacente. Já os rins, a cortical renal demonstrou menor rigidez em relação à região medular.

Num estudo realizado com cães da raça Beagle saudáveis, foi determinado o comportamento elastográfico e o valor de tensão para codificação das cores do elastograma do fígado, baço, rins e próstata. Notou-se que os valores de tensão para o fígado, baço, cortical renal e próstata eram semelhantes, exceto a medular renal, que foi mais baixa (JEON et al., 2015).

Em outra pesquisa, sete cães da raça Beagle, saudáveis, entre dois e três anos de idade, machos, foram submetidos à elastografia para avaliar a glândula tireóide, por meio da pulsação da artéria carótida induzida pela dobutamina, ou seja, um agente de compressão interna. Ao elastograma em cores, a tireóide demonstrou-se homoganeamente verde e a gordura subcutânea superficial ao lobo da tireóide apareceu azul. Os valores de tensão não diferiram entre os cães ou entre o lobo esquerdo e direito da glândula tireóide. Além disso, para os autores, a pulsação da artéria carótida induzida

pela infusão de dobutamina pode ser usada para a elastografia da tireóide canina com excelente repetibilidade (LEE et al., 2015).

Quanto às afecções esplênicas, a repetibilidade e reprodutibilidade da elastografia na avaliação de nódulos foi avaliada, e se este método poderia diferenciar lesões esplênicas benignas de malignas em vinte e quatro cães, portadores de nódulo único hipocogênico. As lesões malignas tenderam a ter uma compressão maior quando comparado às benignas, mostrando-se menos elásticas, quando comparadas às benignas, comprovando a repetibilidade desta técnica. Os pesquisadores confirmaram que a elastossonografia é capaz de diferenciar lesões esplênicas hipocogênicas malignas das benignas (BARELLA; LODI; FAVERZANI, 2017).

No entanto, em outro estudo, vinte e duas lesões nodulares esplênicas caninas (oito nódulos benignos e seis malignos e oito baços normais) foram submetidas a elastografia qualitativa. Os autores notaram que esta técnica pode ajudar a diferenciar lesões esplênicas benignas de malignas menores que quatro centímetros (ALDER et al., 2013).

O uso da elastografia na avaliação de tecidos neoplásicos ainda é controverso na literatura. Como esses tecidos possuem maior quantidade de células densas, é esperado o aumento da rigidez tecidual (HOLDSWORTH et al., 2014). Vinte e uma cadelas, entre cinco a catorze anos, portadoras de neoplasias mamárias, foram submetidas à sonoelastografia mamária e o estudo concluiu que as lesões malignas podem ser classificadas como moles se houver extensas áreas de necrose (áreas compressíveis) (BARELLA, 2015). Sabe-se que processos patológicos, como por exemplo neoplasias malignas, induzem mudanças nas propriedades mecânicas dos tecidos, uma vez que seu crescimento desorganizado pode levar a uma elasticidade heterogênea da área afetada (SAFTOIU et al., 2006; GARCIA et al., 2009).

Considerando-se as publicações em medicina translacional ou veterinária, até o momento não há trabalhos de elastografia realizados em animais selvagens, que descrevam a avaliação de órgãos hígidos ou que comparem com espécies domésticas.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, L. L. **Ultrassonografia abdominal de tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) machos e fêmeas**. 41f. 2017. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

ALDER, D. et al. Does real-time elastography aid in differentiating canine splenic nodules? **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, p. 491 – 496, september, 2013.

BARELLA, G. **Application of Strain Elastography in the evaluation of mammary lesions in dogs**. 94f. 2015. Doctoral program in veterinary clinical sciences - Università degli Studi di Milano, 2015.

BARELLA, G.; LODI, M.; FAVERZANI, S. Role of strain elastography in differentiating malignant hypoechoic splenic lesions in dogs: preliminary results. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 20, n. 3, p. 255–263, 2017.

BERTASSONI, A. **Ecologia especial e populacional do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) em estação ecológica de domínio Cerrado**. 127f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, São Paulo, 2017.

CALLIADA, F. et al., Ultrasound contrast agents basic principles. **European Journal of Radiology**, v. 27, p. 157–160, 1998

CARVALHO, C.F. et al. Elastography and contrast-enhanced ultrasonography in the early detection of hepatocellular carcinoma in an experimental model of nonalcoholic steatohepatitis. **J Clin Exp Hepatol**. 2013 Jun; v. 3, n. 2, p. 96–101. Published online 2013 May 15. doi: 10.1016/j.jceh.2013.04.004.

CARVALHO, C. F.; CHAMMAS, M. C. Elastografia – uma nova tecnologia associada à ultrassonografia. **Clínica Veterinária**, ano XVII, n. 104, p. 62-70, 2013.

CHOI, S-Y et al. Contrast enhanced ultrasonography of kidney in conscious and anesthetized beagle dogs. **Vet. Med. Sci.**, v. 78, n. 2, p. 239–244, 2016.

COKE, R. L. et al. Dilated cardiomyopathy and amebic gastritis in a giant anteater (*Myrmecophaga Tridactyla*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 33, n. 3, p. 272–279, 2002.

CORREAS, J. M. et al. Ultrasound contrast agents: properties, principles of action, tolerance, and artifacts. **Eur. Radiol.**, v. 11, p. 1316-1328, 2001.

DAR, M. D. et al. Contrast ultrasound imaging and its veterinary clinical applications. **Veterinary World**, v. 2, n. 7, p. 284-285, 2009.

DNIT – Departamento Nacional de Infraestrutura de Transporte, 2012. Disponível em: <https://www.gov.br/dnit/pt-br/assuntos/infraestrutura-rodoviaria>. Acesso em: 20 jan. 2019.

DOMOSŁAWSKA, A. et al. Elastography as a diagnostic tool in the prostate tumour detection in Labrador retriever. **Andrology**, p. 1-3, 2018.

FERRARA, K.; POLLARD, R.; BORDEN, M. Ultrasound Microbubble Contrast Agents: Fundamentals and Application to Gene and Drug Delivery. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 9, p. 415–447, 2007.

FISHER, N. G. et al. Myocardial and microcirculatory kinetics of BR14, a novel third-generation intravenous ultrasound contrast agent, **JACC**, v. 39, n. 3, p. 530–537, February, 2002.

FRIZZELL, L. A.; CARSTENSEN, E. L. Shear properties of mammalian tissues at low megahertz frequencies. **J. Acoust. Soc. Am.**, n. 60, p.1409-1411, 1976.

FROMMER, L. et al. Morphology of the genital organs of male and female giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). **Peer.J.**, v. 9, p. 1-26, 2021.

GARCIA, J. J. I. et al. Second-generation endoscopic ultrasound elastography in the differential diagnosis of solid pancreatic masses - Pancreatic cancer vs. inflammatory mass in chronic pancreatitis. **Rev. Esp. Enferm. Dig.**, v. 101, n. 1, p. 723-730, Madrid, 2009.

GRAMIAK, R. S. R. Echocardiography of the aortic root. **Invest. Radiol.**, v. 3, p. 356–366, 1968.

HEREK, D. et al. Role of strain elastography in the evaluation of testicular torsion. An experimental study. **Ultrasound Med.**, v. 35, p. 75–84, 2016.

HOLDSWORTH, A. et al. Elastography of the normal canine liver, spleen and kidneys. **Vet. Radiol. Ultrasound**, v. 00, n. 0, p. 1–8, 2014.

IGLESAS, L. P. **Morfologia macro e microscópica do pâncreas de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758)**. 46f. 2014. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

IGLESAS, L. P. Trend toward individualization of the endocrine and exocrine portions of the giant anteater pancreas (*Myrmecophaga tridactyla*, Xenarthra). **The Anatomical Record**, v. 300, p.1104–1113, 2017.

JEON, S. et al. Ultrasonographic elastography of the liver, spleen, kidneys, and prostate in clinically normal beagle dogs. **Vet. Radiol. Ultrasound**, v. 56, n. 4, p. 425–431, 2015.

KELER, T. G. et al. Análise anatômica do fígado do tamanduá-bandeira de vida livre. **Anais ZOOTEC – XXVII Congresso Brasileiro de Zootecnia**, Santos, São Paulo, 2017. Disponível em: <https://proceedings.science/zootec/papers/analise-anatomica-do-figado-do-tamandua-bandeira-de-vida-livre>. Acesso em: 15 jan. 2019.

LEE, G. et al. Strain elastography using dobutamine-induced carotid artery pulsation in canine thyroid gland. **Vet. Radiol. Ultrasound**, v. 56, n. 5, p. 549–553, 2015.

LEINONEN, M. **Contrast-enhanced ultrasound of abdominal organs in cats**. 78f. 2011. Academic Dissertation – Department of Equine and Small Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki - Helsinki, 2011.

LIN, Q. et al. Contrast-enhanced ultrasound for detection of traumatic splenic bleeding in a canine model during hemorrhagic shock and resuscitation. **Journal of Medical Ultrasound**, v. 21, p. 207-212, 2013.

LOPES E. R. et al. Ultrassonografia abdominal de tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) mantidos em cativeiro. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 35, n. 11, p. 919-924, novembro, 2015.

LUNA, H. S.; HOSSOTANI, C. M. S.; MOREIRA, F. M. A. Esforços para conservação da espécie *Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758: tecnologias aplicadas à reprodução. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 38, n. 1, p. 10-14, jan./mar., 2014.

LUPSOR, M. et al. Performance of a new elastographic method (ARFI technology) compared to unidimensional transient elastography in the noninvasive assessment of chronic hepatitis C. Preliminary results. **J. Gastrointest Liver Dis.**, n. 18, p. 303-311, 2009.

MACRÌ, F. et al. Quantitative evaluation of canine urinary bladder transitional cell carcinoma using contrast-enhanced ultrasonography. **BMC Veterinary Research**, p. 1-8, 2018.

MADSEN, E. L.; SATHOFF, H. J.; ZAGZEBSKI, J. A. Ultrasonic shear wave properties of soft tissues and tissue like materials. **J. Acoust. Soc. Am.**, n. 74, p. 1346-1355, 1983.

MANTZIARAS, G.; LUVONI, G. C. Ultrasound elastography of the normal canine prostate and testicles. **VIII International Symposium on Canine and Feline Reproduction**, Paris, France, june, 2016.

MAULDIN JR, F. W., et al. Robust principal component analysis and clustering methods for automated classification of tissue response to ARFI excitation. **Ultrasound Med. Biol.**, n. 34, p. 309-325, 2008.

MENEZES, L. T. **Morfologia do tubo digestório do tamanduá bandeira *Myrmecophaga tridactyla* (Pilosa: Myrmecophagidae)**. 79f. 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Uberlândia, 2013.

MIGLINO, M. A. et al. The excretory system of the liver in wild animals. Vi. Biliary ducts of the great anteater (*Myrmecophaga tridactyla*). **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v29, p. 353-357, 1992.

MILLER, A. P.; NANDA, N. C. Contrast echocardiography: new agents. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 30, n. 4, p. 425-434, 2004.

MIRANDA, F. R. et al. Avaliação do risco de extinção de *Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758 no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. **ICMBio**, 2012. <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies/7049-mamiferos-myrmecophaga-tridactyla-tamandua-bandeira.html>. Acesso e: 12 jan 2019.

NAKAMURA, K. et al. Quantitative contrast-enhanced ultrasonography of canine spleen. **Vet. Radiol. Ultrasound.**, v. 50, n. 1, p. 104-108, Jan-Feb, 2009.

NAKAMURA, K. et al. Contrast-enhanced ultrasonography for characterization of focal splenic lesions in dogs. **J. Vet. Intern. Med.**, v.24, p. 1290–1297, 2010.

NAPIER, A. E.; NOFS, S. A.; BOEDEKER, N. C. Serial ultrasonographic evaluation of the non-gravid and gravid uterus of the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) for determination of pregnancy, estimation of parturition date and breeding management. **Proceedings AAZV AAWV Joint Conference**, p. 58, 2009.

NYMAN, H. T. et.al. Contrast-enhanced ultrasonography in normal canine liver. Evaluation of imaging and safety parameters. **Vet. Radiol. Ultrasound**, v. 46, p. 243–250, 2005.

O'BRIEN, R. T. et al. Contrast harmonic ultrasound of spontaneous liver nodules in 32 dogs. **Vet. Radiol. Ultrasound**, v. 45, p. 547–553, 2004.

OHLERTH, S. et al. Contrast harmonic imaging of the normal canine spleen. **Vet. Radiol. Ultrasound.**, v. 48, n. 5, p. 451-456, Sep-Oct., 2007.

OHLERTH, S. et al. Contrast harmonic imaging characterization of canine splenic lesions. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 22, p. 1095–1102, 2008.

PINTO, C. A. V. **Contraste por microbolhas em ultrassonografia no diagnóstico diferencial entre oclusão e pseudo-oclusão da artéria carótida interna: correlação com a angiotomografia**. 85f. 2010. Tese (Doutorado) –

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Radiologia. São Paulo, 2010.

ROSSI, F. et al. Effect of sedation on contrast-enhanced ultrasonography of the spleen in healthy dogs. **Vet. Radiol. Ultrasound**, v. 57, n. 3, p. 276–281, 2016.

SANTOS, A. C. et. al. Morphology of the adrenal glands of giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*, LINNAEUS, 1758) of wildlife. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 32, n. 6, p. 1559-1566, nov./dec. 2016.

SLAPA, R. et al. Shear wave elastography during sonography of adrenal and liver masses: feasibility study. **J. Ultrasound Med.**, n. 30, S1–S120, p. 13-14, april, 2011.

SAFTOIU, A. et al. Analysis of endoscopic ultrasound elastography used for characterisation and differentiation of benign and malignant lymph nodes. **Ultraschall in Med.**, v. 27, p. 535-542, 2006.

THOMPSON, R. et al. Serial ultrasound to estimate fetal growth curves in southern tamandua (*Tamandua Tetractyla*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 48, n. 2, p. 294–297, 2017.

TRINDADE, A. F. P. Aplicação Clínica - **Avaliação da técnica Acoustic Radiation Force Impulse**. 85f. 2013. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2013.

UNGER, E. C. et. al. Therapeutic applications of microbubbles. **European Journal of Radiology**, v. 42, p. 160–168, 2002.

ZHAI, L. et al. An integrated indenter-ARFI imaging system for tissue stiffness quantification. **Ultrason Imaging**, v. 2, n. 30, p. 95-111, 2008.

WDOWIAK, M. Contrast-enhanced ultrasonography (CEUS) in canine liver examination. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 13, n. 4, p. 767-773, 2010.

WHITE, J. et al. Ultrasound elastography of the liver, spleen, and kidneys in clinically normal cats. **Vet. Radiol. Ultrasound**, v. 00, n. 0, p. 1–7, 2013.

CAPÍTULO 3 - OBJETIVOS

3.1 GERAL

Determinar se as técnicas ultrassonográficas com contraste por microbolhas e de elastografia *strain* descritas em cão, podem ser aplicadas com sucesso no tamanduá bandeira, uma espécie selvagem, permitindo contribuir com a aquisição dos parâmetros de normalidade para esta espécie para possam ser utilizados em diagnósticos clínicos e em estudos científicos.

3.2 ESPECÍFICOS

1 – Verificar se a dose do contraste por microbolhas utilizada para avaliação hepática no cão pode ser utilizada com êxito no tamanduá bandeira;

2 – Determinar os tempos de *wash-in*, *wash-out* e de pico de contraste por microbolhas no parênquima hepático, comparando com a espécie canina;

3 – Determinar se a anestesia exerce influência nos tempos de *wash-in*, *wash-out* e de pico de contraste por microbolhas no parênquima hepático na espécie canina e no tamanduá bandeira;

4 – Determinar no tamanduá bandeira o padrão do sonoelastograma do parênquima hepático, renal e esplênico para a espécie e comparar com a espécie canina.

CAPÍTULO 4 - HIPÓTESES

Não há diferença no padrão do elastograma entre as espécies em estudo, tamanduás bandeira e cães.

É possível usar a mesma técnica ultrassonográfica de contraste por microbolhas hepática descrita no cão para o tamanduá bandeira.

A anestesia não influencia nos tempos de *wash-in*, *wash-out* e de pico de contraste.

CAPÍTULO 5 - B-MODE ULTRASONOGRAPHY AND STRAIN ELASTOGRAPHY IN LIVER, SPLEEN AND KIDNEYS OF THE DOG (*Canis lupus familiaris*, Linnaeus, 1758) AND GIANT ANTEATER (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758)

5.1 ABSTRACT

The giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758) is among the wild species victims of roadkill and fire, making it vulnerable to extinction. The main objective of this work was to standardize and described the sonoelastography technique in the giant anteater as a non-invasive diagnostic tool. Three experimental groups were studied: Group 1 with 10 giant anteaters and Groups 2 and 3 with five dogs each. Individuals in groups 1 and 2 underwent the same chemical restraint protocol and individuals in group 3 did not receive chemical restraint. All subjects were evaluated clinically and by laboratory tests to certify that they were healthy. For ultrasound evaluations of the liver, spleen, and kidneys, the ACUSON NX3 ELITE/SIEMENS ultrasound system, B-mode image, and convex and linear transducers were used. Subsequently, these organs were evaluated with the sonoelastography software in color mapping (tones of red, green and blue), to evaluate tissue hardness. Liver with heterogeneous deformity, predominantly non-deformable spleen, and kidneys with non-deformable cortical and medullary were observed. The sonoelastography technique described in dogs was successfully applied to the giant anteater, helping to determine the normal sonoelastographic pattern of the liver, spleen, and kidneys.

Keywords: Elastography; Giant Anteater; Kidney; Liver; Spleen.

5.2 INTRODUCTION

The giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758) belongs to the phylum Chordata, class Mammalia, order Pilosa and family

Myrmecophagidae, and has a wide geographic distribution throughout Brazil. However, in recent years, the species is considered vulnerable to extinction (MIRANDA et al., 2012), as it presents a reduction in the number of individuals due to being run over on highways, fires, deforestation to increase areas destined for agriculture, livestock and implementation of new roads, in addition to being targets of hunting practices and poisoning by insecticides used to control agricultural pests (MIRANDA et al., 2012; LUNA et al., 2014). Therefore, scientific studies are necessary for the preservation of this species, as well as for a better understanding of some methods of veterinary medical evaluation, including imaging tests, such as ultrasonography.

Victims of mainly automobile trauma on highways, anteaters represent about 4.16% of the animals of the Brazilian fauna that are run over annually (DNIT, 2012). The animals rescued by public agencies are directed to support units for veterinary emergency care, such as universities, zoos, and environmental preservation centers. Therefore, an accurate clinical evaluation is necessary to determine the appropriate diagnosis and therapy for these animals. In terms of complementary exams, imaging exams are essential for the evaluation of patients with a history of trauma, such as radiographic exams, which are already described in the literature for this species (BOGOEVICH, 2011; RODRIGUES; LEOMIL; FRUHVALLD, 2021), and ultrasonography.

Research on the use of ultrasonography mostly involve case reports and the standardization of techniques, such as B-mode image assessment (LOPES, 2015; ALBUQUERQUE, 2017). However, to date, there are no data in the literature regarding the standardization and description of the application of advanced ultrasound techniques such as Doppler, microbubble contrast, and elastography in giant anteaters.

Advanced ultrasound techniques are generally applied in veterinary medicine for companion animals, providing important data that contribute to the diagnosis of some conditions. Thus, this study becomes important, as it will help to standardize aspects of normality for the giant anteater, in addition to providing data for future studies in this and other species of wild animals. The use of sonoelastography can help in the diagnosis and prognosis of emergency

situations or in cases of internal medicine in the rescues carried out in this endangered species.

Based on that, this study aimed to determine whether the sonographic technique of sonoelastography described in the dog can be successfully applied to the giant anteater, a wild species, contributing to the acquisition of normal parameters for this species.

5.3 MATERIALS AND METHODS

This study was carried out after approval by the Ethics and Animal Welfare Committee of Rio Preto University Center – UNIRP, Brazil (protocol nº 09/2019) and by the National System of Biodiversity Information (SISBIO/IBAMA 70260- 1).

Group 1 consisted of ten healthy adult anteaters, four males and six females, from 25 kg of live weight (mean weight = $31.5 \text{ kg} \pm 5.09$), and groups 2 and 3 (controls) were formed by five healthy, adult dogs each, with group 2 consisting of four males and one female, from 25 kg of live weight (mean weight = $27.38 \text{ kg} \pm 3.75$), and group 3 by four males and one female, from 25 kg of live weight (mean weight = $26.06 \text{ kg} \pm 2.43$). In group 2, the protocol of chemical restraint (anesthesia) of group 1 was performed. Group 3 did not receive chemical restraint.

The animals remained in food and water fasting for 12 hours. The animals belonging to group 1 were sedated with ketamine hydrochloride (dose of 10 mg/kg intramuscularly), together with midazolam (0.3 mg/kg intramuscularly), being subjected to induction with propofol at a dose of 1 mg/kg intravenously, anesthetic maintenance with intravenous propofol and 100% oxygen (O₂) support via mask (WEST; HEARD; CAULKETT, 2007).

With the animals anesthetized, the physical examination was performed, the collection of blood samples for health assessment and the ultrasound examination of the abdominal region. Urine sample was collected by cystocentesis. Group 2 animals were sedated with ketamine hydrochloride (dose 5-10 mg/kg intravenously), together with midazolam (0.5 mg/kg intravenously), induction with propofol at a dose of 1 to 6 mg/kg intravenously,

anesthetic maintenance with intravenous propofol and oxygen (O₂) support via endotracheal tube (FANTONI; CORTOPASSI, 2009).

During the chemical restraint of the animals in this group, an ultrasound examination of the abdominal region was performed, and a urine sample was collected by cystocentesis.

Complete clinical examination and complementary laboratory tests (creatinine, urea, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, total protein, albumin, triglycerides, cholesterol, glucose, urinalysis and coproparasitological) to assess the health status were performed in all animals, and only those that were healthy were used in this study.

After selecting the animals, the trichotomy of the abdominal region was performed and gel was applied to the abdominal skin for the ultrasound examination. This examination was performed by the same veterinarian qualified and experienced in the technique in all animals using the ACUSON NX3 ELITE/SIEMENS system, with multifrequency transducers, being convex (CH5-2 from 2.0 to 5.0 MHz), microconvex (C8-5 from 3.1 to 8.8 MHz) and linear (VF12-4 from 4.0 to 12.0 MHz) for B-mode image.

The organs were evaluated in at least two image planes, longitudinal and transversal, to collect data on their anatomical-topographic relations, contour (regular or irregular), shape (normal or abnormal), size, wall thickness, echotexture (homogeneous or heterogeneous) and echogenicity (anechoic, hypoechoic, hyperechoic or mixed). B-mode image assessments were performed prior to the elastography technique.

After the B-mode evaluation, the liver, spleen, and kidneys of the animals were examined with the linear transducer (VF12-4 from 4.0 to 12.0 MHz) and the sonoelastography software, with a compression force being applied parallel to the tissue, in a gentle way, but completing the compression quality bar, forming images in the tissue color mapping (hepatic, splenic and renal), for the evaluation of relative tissue stiffness (elastogram).

For the elastogram formed in color mapping, the red regions represented the most elastic tissue (less rigid), the green regions represented the tissue with intermediate elasticity and the blue regions represented the least elastic (more rigid). These images were compared to those obtained by the corresponding

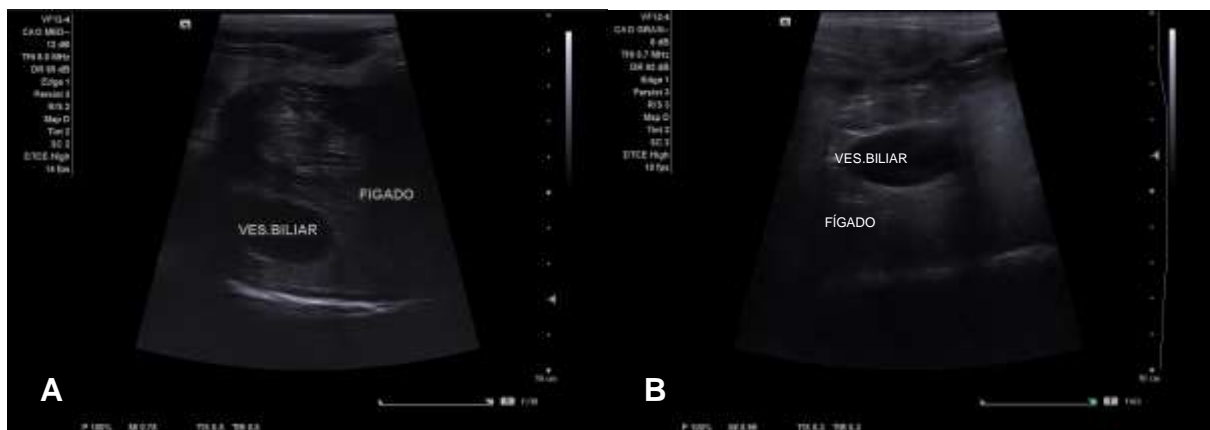
conventional ultrasound to identify the respective regions subjected to compression.

5.4 RESULTS

Abnormalities of echogenicity, echotexture, shape, size, and contours were not observed in the livers, spleens and kidneys of all animals evaluated by B-mode image.

In dogs and anteaters, the liver had characteristic echogenicity (hypoechoogenicity), homogeneous echotexture, fine, regular margins, and usual topography (Figure 1).

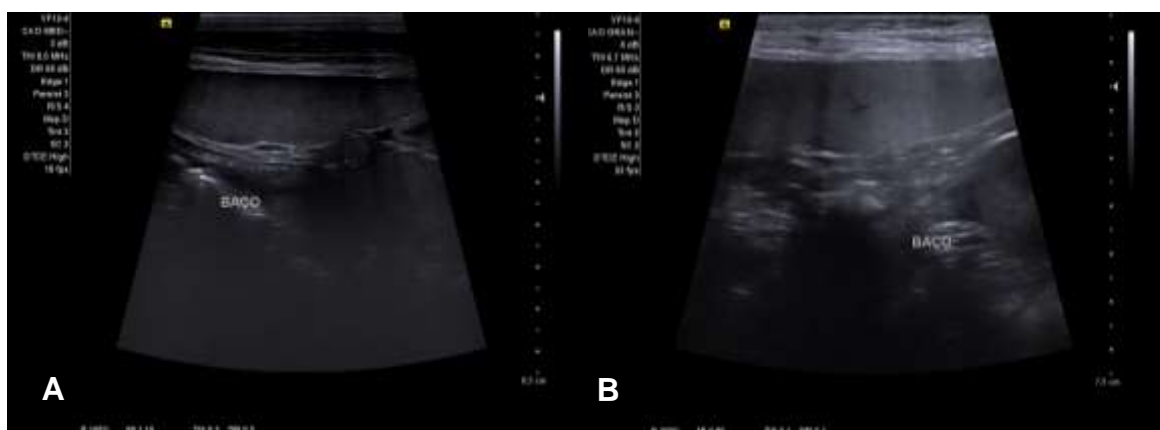
Figure 1 – B-mode image of the liver and gallbladder of the giant anteater (A) and the dog (B).



Source: personal archive.

In the B-mode image examination, the spleens were hyperechoic in relation to the liver and the left renal cortex, with homogeneous echotexture, fine and regular contours, and preserved dimensions (Figure 2).

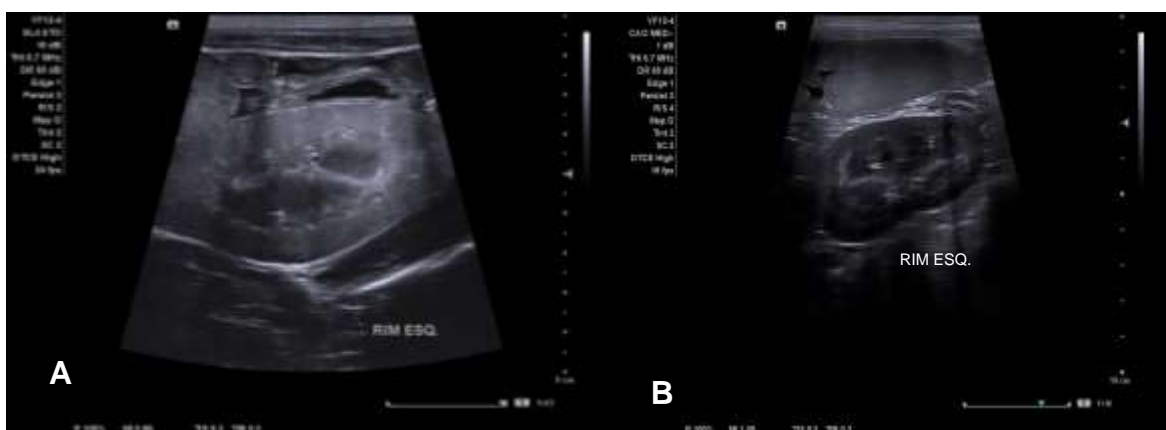
Figure 2 – B-mode image of the spleen of the giant anteater (A) and the dog (B). Noted small free fluid near the spleen of the giant anteater (A).



Source: personal archive.

In the B-mode image evaluation of the kidneys of all animals, the right kidney was identified cranially in relation to the left. An anatomical relationship was observed between the left kidney and the splenic silhouette and gastric greater curvature, and between the right kidney and the hepatic silhouette. As for echogenicity, the renal cortex was hypoechoic compared to the liver and spleen, the medullary region was hypoechoic in relation to the renal cortex and the renal pelvis was hyperechoic (Figure 3). The contours were regular, with an oval shape in the sagittal section and the corticomedullary relationship was preserved.

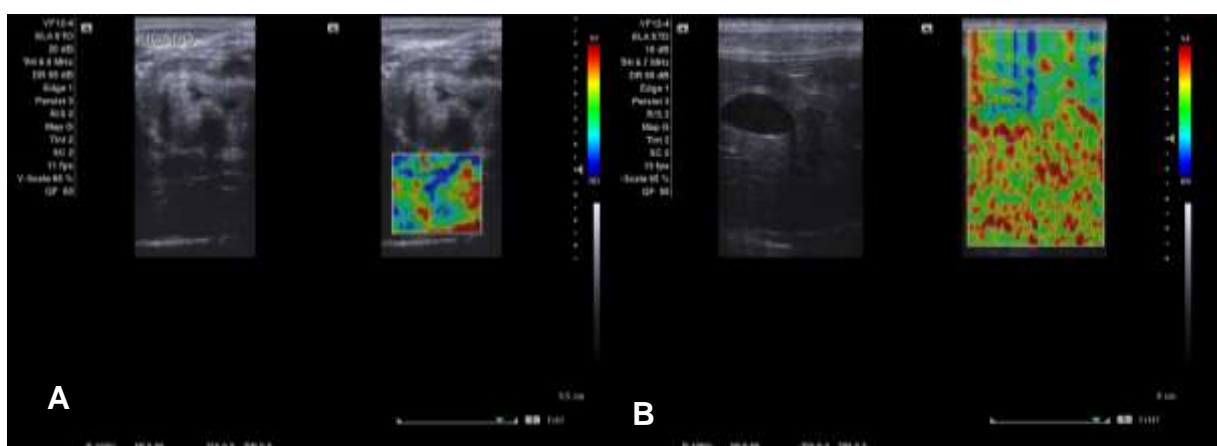
Figure 3 – B-mode image of the kidney of the giant anteater (A) and the dog (B). Noted small free fluid near kidney of the giant anteater (A).



Source: personal archive.

Hepatic sonoelastography was performed in all animals, being the most difficult technique to perform in anteaters due to the anatomy of the thoracic region (narrow and deep chest). However, splenic, and renal sonoelastography were performed in all animals without any difficulty. In the liver, parenchymal heterogeneity was observed, with deformable areas (corresponding to the hepatic vessels and bile ducts) and non-deformable areas of parenchyma (Figure 4).

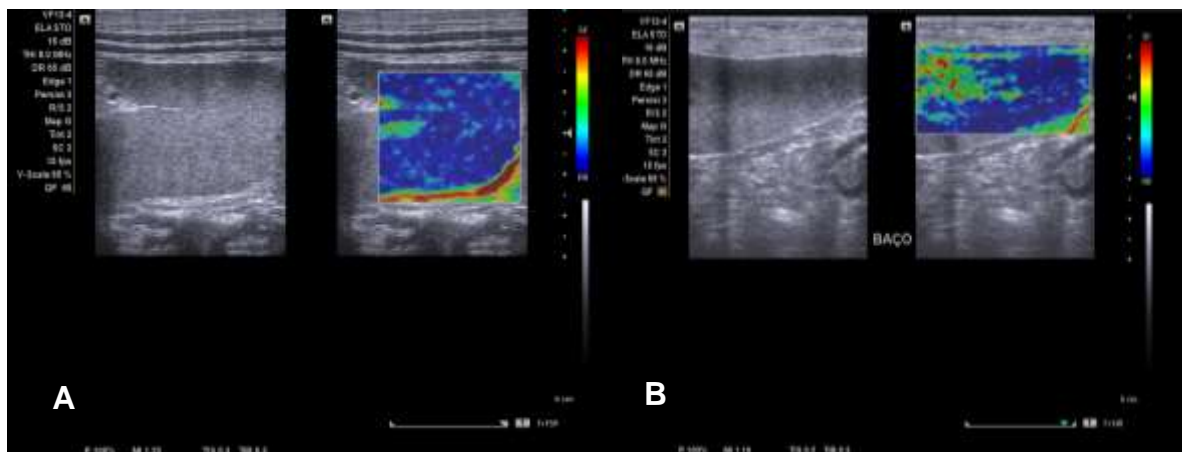
Figure 4 – Hepatic sonoelastography of the giant anteater (A) and the dog (B).



Source: personal archive.

On splenic sonoelastography, the parenchyma was not deformable, represented by a homogeneous image and medium blue to dark blue on the color mapping; on the other hand, the splenic capsule was deformable, represented by a homogeneous image and red on the color mapping (Figure 5). These characteristics were observed in all animals in all groups studied.

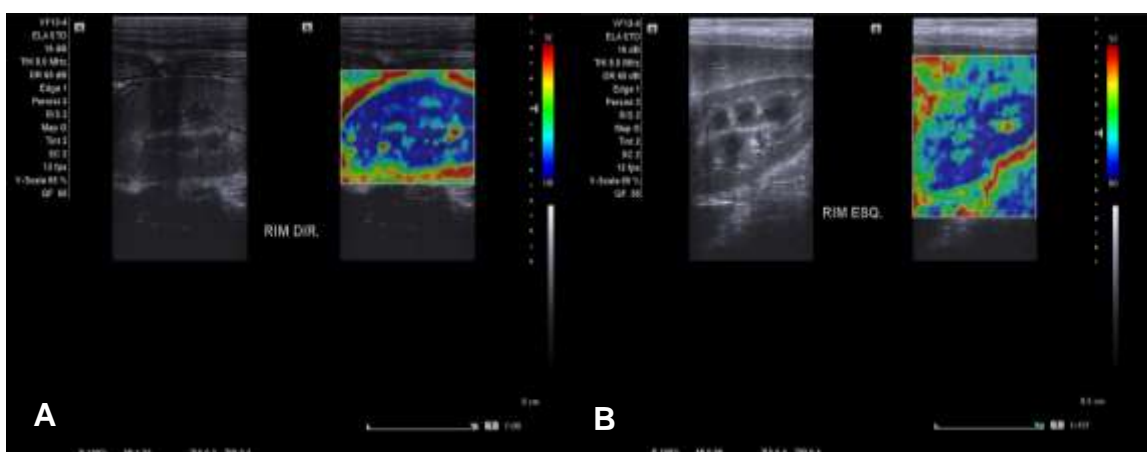
Figure 5 – Splenic sonoelastography of the giant anteater (A) and the dog (B).



Source: personal archive.

In the kidney of anteaters and dogs, the cortical region is not deformed by slight compression, being homogeneous and in medium blue color, slightly less rigid when compared to the medullary region, which was not deformable, being homogeneous and dark blue in color. The renal capsule was highly deformable, homogeneous, and red in color, while in the renal pelvis intermediate elasticity was observed, in a green shade on the color mapping (Figure 6).

Figure 6 – Renal sonoelastography of the giant anteater (A) and the dog (B).



Source: personal archive.

5.5 DISCUSSION

B-mode image is the most used ultrasonography in veterinary medicine, both in domestic and wild animals, for non-invasive and real-time complementary clinical diagnoses. In wild animals, species with different anatomical and physiological characteristics, specific ultrasound studies of these animals are extremely important for a better understanding of the imaging findings and correlation with the patient's clinical alteration. It is noteworthy that, for this understanding, it is necessary to know the expected ultrasound normality patterns for each species.

In this study, in all giant anteaters, the hepatic silhouette was observed from the xiphoid region, in the cranial abdominal portion, as well as the presence of the gallbladder, as reported by Keler et al. (2017). It is important to mention that in the giant anteaters, due to their narrow and deep thorax, the hepatic silhouette was limited inside the rib cage.

In the evaluated dogs, the liver was located in the cranial abdominal region, cranial to the spleen and the right kidney, with the gallbladder in a rounded shape, as seen by Nyland et al. (2005) and D'Anjou (2011). As for the hepatic ultrasound appearance of dogs, like that of giant anteaters, the margins were thin and regular and the parenchyma had a homogeneous and hypoechogenic echotexture in relation to the spleen, according to D'Anjou (2011), Mamprim and Sartor (2014) and Lopes et al. (2015). In a study carried out by Ribeiro et al. (2013) with coatis, a slightly heterogeneous echotexture was observed, being also observed in marmosets (*Callithrix jacchus*; Wagner and Kirberger, 2005) and in maned wolves (Guimarães et al. 2013).

In both dogs and anteaters, the gallbladder presented a rounded shape when cross-sectioned, being filled with anechogenic and homogeneous content, with a thin and hyperechogenic wall, in accordance with the studies of D'Anjou (2011), Mamprim and Sartor (2014), Lopes et al. (2015) and Albuquerque (2017). The same ultrasound description was also observed in coatis (Ribeiro et al. 2013) and in capuchin monkeys (Alves et al. 2007). In all animals evaluated, the spleen was observed in the left epigastric region up to the middle region, in a ventral direction, with no difference in terms of anatomical location between

the species. In the ultrasound evaluation, no difference was noted in relation to the echogenicity and echotexture of the splenic parenchyma between the species, as well as in relation to the echogenicity of the splenic capsule, corroborating the studies by Hecht (2011) and Tannouz (2014) in studies with dogs, and Lopes et al. (2015) and Albuquerque (2017) in research with anteaters, as reported in coatis by Ribeiro et al. (2013).

In maned wolves, a hyperechoic splenic capsule was also observed, however, the parenchymal echogenicity is like that of the left renal cortex, a characteristic observed in most individuals of this species, as pointed out in the studies by Guimarães et al. (2013), differing from what was observed in this study in dogs and anteaters, being hyperechogenic compared to the left renal cortical bone.

In the renal evaluation, the right kidney was found cranially in relation to the left one. Albuquerque (2017) found that the right kidney was not embedded in the renal fossa of the right hepatic lobe, this was also found in the anteaters in this study. An anatomical relationship of the left kidney with the splenic silhouette and greater gastric curvature was observed, in addition to regular contours, with an oval shape at the sagittal cut in anteaters and dogs.

Regarding echogenicity, hypoechoic renal cortical bone was observed (compared to liver and spleen), anechoic medullary region in relation to cortical bone, hyperechogenic renal pelvis and preserved corticomedullary relationship, as described in capuchin monkeys (Alves et al. 2007), in dogs (D'Anjou, 2011; Vac, 2014), in coatis (Ribeiro et al. 2013), in maned wolves (Guimarães et al. 2013) and in anteaters (Albuquerque 2017). Wagner and Kirberger (2005) evaluated the abdominal organs by ultrasound of marmosets (*Callithrix jacchus*) and noted that the renal cortex is hyperechogenic in relation to the spleen, which differs from what was observed in this study. As for renal topography, anteaters were found to be slightly more caudal when compared to the kidneys of dogs, as reported by Lopes et al. (2015).

A similar description was made by Ribeiro et al. (2013) in coatis. During the abdominal ultrasound scan of the giant anteaters, discrete anechogenic and homogeneous free content was identified in the abdominal cavity (in laminar quantity), not identified in the dogs. This accumulation of fluid was seen by

Lopes et al. (2015), being considered an expected imaging finding for the species. It is worth remembering that all animals in this study were evaluated in relation to total plasma protein and albumin, which presented values within the normal range expected for the species.

Regarding elastography, according to Carvalho and Chamas (2013), organs have tissue constitution and organization that determine their mechanical properties, which can present structural changes through the conditions. Therefore, knowing the elasticity of a given structure can be useful in determining conditions that were not detected in B-mode image. For Carvalho et al. (2013) and Trindade (2013), elastography is a technique that can be used to assess tissue elasticity/rigidity.

In this study, it was proposed to evaluate the application of hepatic, splenic and renal sonoelastography, already described in domestic animals, such as the dog, in a wild species, the giant anteater.

To perform the hepatic sonoelastography, a linear transducer was used. However, there was some difficulty in performing the technique in anteaters, due to the coupling of the transducer in the xiphoid region, requiring the application of a greater force when compared to dogs. This can be explained due to the anatomy of the rib cage (narrow and deep) of anteaters. A similar difficulty can be faced in dogs with a narrow and deep chest. It should be noted that compression was facilitated in anesthetized dogs when compared to non-anesthetized dogs. It is important to emphasize that anesthesia did not influence the results observed regarding the elastogram of the organs evaluated between anesthetized and non-anesthetized dogs.

The paracostal window in anteaters was not effective for performing the technique, since the intercostal space did not allow adequate contact of the transducer used with the area of interest to be compressed, in addition to the muscle stiffness presented, even with the animals anesthetized.

Heterogeneous hepatic parenchyma, with deformable (corresponding to hepatic vessels and bile ducts) to non-deformable areas, was observed. White et al. (2013) evaluated ten healthy adult felines by strain elastography and noted that the hepatic parenchyma had homogeneous stiffness.

Splenic sonoelastography was performed without difficulties in all animals in this study. A rigid and homogeneous parenchyma and a deformable and homogeneous splenic capsule were observed, similar to what was reported by Jeon et al. (2015) in healthy beagles, where the splenic parenchyma was verified with a homogeneous and rigid pattern on the elastogram. In studies with felines, White et al. (2013) noted that the splenic parenchyma had homogeneous rigidity, corroborating the findings of this study.

As the splenic evaluation of healthy animals was performed in this study, no ultrasound changes were identified. Alder et al. (2013), Barella (2015) and Barella et al. (2017) applied sonoelastography to evaluate splenic nodular lesions in dogs and found that malignant lesions tend to be more rigid, while benign lesions tend to be more elastic. However, it is important to remember that malignant lesions may present necrosis areas, which may make them soft. Therefore, knowing the pattern of normality of this organ in the face of the technique, it is possible to use it to predict whether there is a degree of malignancy in a given lesion.

In the renal evaluation, in all the animals studied, the renal cortical bone was less deformable in relation to the renal medulla, corroborating Jeon et al. (2015) when evaluating beagles. Thanaboonipat et al. (2020) evaluated dogs and cats with chronic kidney disease and observed that in the control group (healthy animals) the renal cortical was less deformable in relation to the renal medulla. In sick animals, they observed an increase in renal cortical stiffness. However, White et al. (2013), studying healthy cats, observed that the renal cortical was more compressive compared to the medullary, which is different from what was observed in this study.

It is believed that, after the standardization of elastography of healthy giant anteater liver, spleen and kidneys, this technique can be applied in various pathologies, aiding in diagnoses.

5.6 CONCLUSION

The elastography technique described in dogs can be successfully applied to the giant anteater, being an ultrasound technique of complementary

clinical examination that may provide important information for more accurate diagnoses in this species.

REFERENCES

ALBUQUERQUE, L. L. **Ultrassonografia abdominal de tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) machos e fêmeas.** 41f. 2017. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

ALDER, D. et al. Does real-time elastography aid in differentiating canine splenic nodules? **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, p. 491 – 496, september, 2013.

ALVES, F. R. et al. Avaliação ultrassonográfica do sistema urinário, fígado e útero do macaco do macaco-prego, *Cebus apella*. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 27, n. 9, p. 377-382, 2007.

BARELLA, G. **Application of Strain Elastography in the evaluation of mammary lesions in dogs.** 94f. 2015. Doctoral program in veterinary clinical sciences - Università degli Studi di Milano, 2015.

BARELLA, G.; LODI, M.; FAVERZANI, S. Role of strain elastography in differentiating malignant hypoechoic splenic lesions in dogs: preliminary results. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 20, n. 3, p. 255–263, 2017.

BOGOEVICH, A. M. **Tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*): anatomia aplicada a radiografia e tomografia do aparato hióide e coluna vertebral.** 67f. 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Goiânia, 2011.

CARVALHO, C. F.; CHAMMAS, M. C. Elastografia – uma nova tecnologia associada à ultrassonografia. **Clínica Veterinária**, ano XVII, n. 104, p. 62-70, 2013.

DNIT – **Departamento Nacional de Infraestrutura de Transporte**, 2012. Disponível em: <https://www.gov.br/dnit/pt-br/assuntos/infraestrutura-rodoviaria>. Acesso em: 20 jan. 2019.

FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em cães e gatos**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2009.

GUIMARÃES, L. D. et al. Abdominal and pelvic ultrasound study of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, n. 2, p. 265-272, 2013.

HECHT, S. Baço. In: Penninck, D. **Atlas de Ultrassonografia de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Cap 7.

JEON, S. et al. Ultrasonographic elastography of the liver, spleen, kidneys, and prostate in clinically normal beagle dogs. **Vet. Radiol. Ultrasound**, v. 56, n. 4, p. 425–431, 2015.

KELER, T. G. et al. Análise anatômica do fígado do tamanduá-bandeira de vida livre. **Anais ZOOTEC – XXVII Congresso Brasileiro de Zootecnia**, Santos, São Paulo, 2017. Disponível em: <https://proceedings.science/zootec/papers/analise-anatomica-do-figado-do-tamandua-bandeira-de-vida-livre>. Acesso em: 15 jan. 2019.

LOPES, E. R. et al. Ultrassonografia abdominal de tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) mantidos em cativeiro. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 35, n. 11, p. 919-924, novembro, 2015.

LUNA, H. et al. Esforços para conservação da espécie *Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758: tecnologias aplicadas à reprodução. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 38, n. 1, p. 10-14, jan./mar., 2014.

MAMPRIM, M. J; SARTOR, R. Fígado e vesícula biliar. In: CARVALHO, C. F. **Ultrassonografia de pequenos animais**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2014. Cap.6.

MIRANDA, F. R. et al. Avaliação do risco de extinção de *Myrmecophaga Tridactyla* Linnaeus, 1758 no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. **ICMBio**, 2012. <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies/7049-mamiferos-myrmecophaga-tridactyla-tamandua-bandeira.html>. Acesso e: 12 jan 2019.

NYLAND, T. G. et al. **Ultrassom diagnóstico em pequenos animais**. 2 ed. São Paulo: Roca. 2005.

RIBEIRO, R. G. et al. Normal sonographic anatomy of the abdomen of coatis (*Nasua nasua* Linnaeus 1766). **BMC Veterinary Research**, v. 9, n.1, 2013.

RODRIGUES, G. B.; LEOMIL, F. R.; FRUHVALLD, E. Estudo comparativo anatomoradiográfico do tórax de um indivíduo de Tamanduá Bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*). **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v.4, n.1, p. 146-156, 2021.

TANNOUZ, V. G. S. Baço. In: CARVALHO, C. F. **Ultrassonografia de pequenos animais**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2014. Cap.8.

THANABOONNIPAT, C. et al. Renal ultrasonographic strain elastography and symmetric dimethylarginine (SDMA) in canine and feline chronic kidney disease. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 82, n. 8, p. 1104-1112, 2020.

TRINDADE, A. F. P. **Aplicação Clínica - Avaliação da técnica Acoustic Radiation Force Impulse**. 85f. 2013. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2013.

VAC, M. H. Sistema urinário rins, ureteres, bexiga urinária e uretra. In: CARVALHO, C. F. **Ultrassonografia de pequenos animais**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2014. Cap.10.

WAGNER, R. M.; KIRBERGER, R. M. Transcutaneous ultrasonography of the abdomen in the normal common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Vet. Radiol. Ultrasound**, v. 46, n. 3, p. 251-258, 2005.

WEST, G., HEARD, D., CAULKETT, N. Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia. Second edition. **Wiley-Blackwell**. Chapter 39, 533-537, 2007.

WHITE, J. et al. Ultrasound elastography of the liver, spleen, and kidneys in clinically normal cats. **Vet. Radiol. Ultrasound**, v. 00, n. 0, p. 1–7, 2013.

CAPÍTULO 6 - ULTRASOUND OF THE LIVER USING A MICROBUBBLE CONTRAST AGENT IN GIANT ANTEATER (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758)

6.1 ABSTRACT

Native to America, the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758) is a target of illegal hunting and being run over. Rescued animals are directed to emergency care, so an adequate clinical evaluation is necessary to determine diagnosis and treatment. Imaging exams are essential for evaluating patients with a history of trauma, such as radiography and ultrasound. The objective of this work was to standardize and describe the ultrasound technique using a microbubble contrast agent in the liver of giant anteaters. Three experimental groups were studied. Group 1 consisted of 10 giant anteaters and groups 2 and 3 of five dogs each. The animals in groups 1 and 2 were anesthetized and the animals in group 3 did not receive any anesthetic drug. The ultrasound examination was performed with the ACUSON NX3 ELITE/SIEMENS system, in B-mode image, with convex and linear multifrequency transducers, for abdominal scanning. The liver was evaluated after injection of microbubbles contrast agent (sulfur hexafluoride; SonoVue®) using specific software, verifying the presence or absence of microbubbles, wash-in, wash-out and peak contrast times. The arterial phase between anesthetized and conscious dogs was similar but differed when compared to that of the anteaters. The wash-in time was different for anteaters when compared to anesthetized dogs. In the peak contrast, a difference was also observed between anteaters and dogs. It is concluded that ultrasound with microbubble contrast agents can be used to assess the hepatic perfusion of anteaters in a minimally invasive manner.

Keywords: Giant Anteater; Microbubble Contrast Agent in the Liver; Sulfur Hexafluoride; Ultrasound.

6.2 INTRODUCTION

Ultrasonography is a non-invasive complementary examination modality used to assess the size, shape, contour, parenchyma and vascularization of various organs. However, the ultrasonographic image has little contrast due to similar acoustic properties in soft tissues. As for vascularization, the Doppler mode provides information on blood flow, but it is not able to promote the visualization of small vessels and capillaries. To this end, there is the possibility of increasing the effectiveness of ultrasound by use of intravenous contrast agents consisting of gas microbubbles (WDOWIAK et al., 2010). This is possible due to the ability of these agents to increase the reflectivity of ultrasound waves on blood components, increasing diagnostic accuracy (PINTO, 2010).

The discovery and subsequent development of microbubble contrast agents came from an observation by cardiologist Dr. Charles Joiner in the late 1960s. When performing the M-mode echocardiography, the substance indocyanine green was injected into the circulation to measure cardiac output, through a catheter located in the left ventricle. Transient increases in ultrasound signals in the ventricle were observed after each injection. Subsequent research showed that the increase in ultrasound signals was caused by small air bubbles that formed at the tip of the catheter (GRAMIAK; SHAH, 1968).

Microbubble contrast agents can be classified into the first generation, which comprise the use of air itself as a gaseous agent, for example, the intravenous administration of stirred saline solution of 0.9% sodium chloride. However, these contrast agents have low longevity and rapid diffusion of gas bubbles (CALLIADA et al., 1998; MILLER; NANDA, 2004; WDOWIAK et al., 2010).

Subsequently, albumin was found to improve the quality and stability of microbubbles, resulting in the development of the first pharmaceutical contrast agent, Albunex™ (WDOWIAK et al., 2010). Another example of first-generation contrast agent is Levovist® (CALLIADA et al., 1998; PINTO, 2010). In addition to albumin, other compounds are capable of stabilizing microbubbles, such as phospholipids, more specifically surfactants, which

reduce their diffusion, increasing their residence time in the circulation and their ability to deal with pressure variations (MILLER; NANDA, 2004).

Second-generation microbubble contrast agents are made up of fluorocarbon gases, perfluorocarbon hexafluoride or sulfur, which are of high molecular weight, therefore have lower solubility and greater diffusion capacity, providing greater stability to the microbubbles and greater persistence in the circulation (CALLIADA et al., 1998; CORREAS et al., 2001). Examples of second-generation microbubble contrast agents are SonoVue®, Optison®, Definity® and PESDA (CALLIADA et al., 1998; PINTO, 2010). Third-generation microbubble contrast agents are composed of microbubbles with smaller dimensions than the second-generation ones and made of perfluorobutane gas, remaining longer in the circulation, such as Bracco's BR14 (FISHER et al., 2002).

The use of this technique in veterinary medicine is recent and was described in small animals in liver evaluation in dogs (NYMAN et al., 2005; WADOWIAK et al., 2010), in distinguishing benign and malignant hepatic lesions based on perfusion patterns (O'BRIEN et al., 2004; CARVALHO et al., 2013), in the splenic evaluation of healthy dogs (OHLERTH et al., 2007; NAKAMURA et al., 2009), in patients with nodular lesions (OHLERTH et al., 2008; NAKAMURA et al., 2010), and in dogs submitted to sedation (ROSSI et al., 2016), in echocardiography to assess perfusion in the diagnosis of myocardial infarction (DAR et al., 2009), in renal perfusion studies of healthy and anesthetized dogs (CHOI et al., 2016), in the evaluation of transitional cell carcinoma in the urinary bladder in a dog (MACRÌ et al., 2018) and in the evaluation of the organs of the abdominal cavity in felines (LEINONEN, 2011).

Lin et al. (2013) performed the ultrasonography with a microbubble contrast agent in dogs with iatrogenic traumatic splenic injuries. A perfusion defect and lack of contrast of the injured area of the splenic parenchyma was observed and in cases of traumatic active hemorrhage there was extravasation of contrast agent in the injured region. Changes in blood perfusion and interruption of arterial contrast have been observed in cases of active bleeding. For the authors, this technique is capable of monitoring splenic trauma and detecting bleeding in real time.

In general, ultrasound with a microbubble contrast agent provides information on the organ perfusion or lesion, which can be useful for categorizing lesions and for determining sites for biopsy procedures. In addition, they may have therapeutic applications (UNGER et al., 2002), as when linked to genes or drugs they can be targeted and incorporated into spherical microbubbles for specific diagnosis and therapeutic functions. As the agents are encapsulated in bubbles, systemic toxic effects are minimized (FERRARA; POLLARD; BORDEN, 2007). Localized energy deposition associated with bubble destruction can also be used for clot dissolution (DAR et al., 2009).

Veterinary research was carried out in small animals, however, there are no published data regarding the standardization and application of this technique in wild animals. This study aims to apply the technique of hepatic ultrasound with a microbubble contrast agent described in dogs in the giant anteater, describing the normal pattern expected for this species.

6.3 MATERIALS AND METHODS

This study was carried out in the Diagnostic Imaging sector of the Veterinary Hospital "Dr. Halim Atique" of Rio Preto University Center – UNIRP, with prior approval from the Ethics Commission on Animal Use (CEUA protocol nº 09/2019) of Rio Preto University Center – UNIRP and the National System of Biodiversity Information (SISBIO/IBAMA 70206-1).

The experimental groups were: Group 1 (G1) with 10 healthy adult giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758), six females and four males, with body weight starting at 25 kg (mean weight = 31.5 kg ± 5,09). These animals were obtained from routine and from the São José do Rio Preto Municipal Zoo.

Groups 2 and 3 (G2 and G3; control groups) were formed by five healthy adult dogs each. Group 2 consisted of one female and four males, with body weight starting at 25 kg (mean weight = 27.38 kg ± 3.75). Group 3 was also formed by one female and four males, from 25 kg (mean weight = 26.06 kg ± 2.43). These dogs were obtained from the routine of the Clinical-Surgical Care Sector for Small Animals of the Veterinary Hospital "Dr. Halim Atique" from the

Rio Preto University Center – UNIRP. In group 2, the same protocol of chemical restraint (anesthesia) of group 1 was performed (see details below). In group 3, no chemical restraint was performed.

Only animals considered healthy, without changes in physical examination and laboratory tests were selected for this study. For this, the animals underwent clinical evaluation comprising anamnesis, physical examination, complete blood count, biochemical profile (creatinine, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, total protein, albumin, triglycerides, cholesterol, glucose), urinalysis and coproparasitological examination.

For chemical restraint, the animals were fasted for food and water for 12 hours. Group 1 animals were physically restrained with the help of nets, and then sedated with ketamine hydrochloride (10 mg/kg intramuscularly) with midazolam (0.3 mg/kg intramuscularly) and transported to the Veterinary Hospital “Dr. Halim Atique” from Rio Preto University Center – UNIRP, being submitted to anesthetic induction with propofol at a dose of 1 mg/kg intravenously, anesthetic maintenance with intravenous propofol and 100% oxygen (O₂) support via mask (West; Heard; Caulkett, 2007). Blood samples were collected for laboratory tests and ultrasound examination of the abdominal region. The urine sample was collected by ultrasound-guided cystocentesis. During all procedures, the animals were monitored for vital parameters (cardiopulmonary auscultation, femoral pulse, and rectal temperature).

Group 2 animals were sedated with ketamine hydrochloride (dose of 5-10 mg/kg intravenously) and midazolam (0.5 mg/kg intravenously). Anesthetic induction with propofol at a dose of 1 to 6 mg/kg intravenously, anesthetic maintenance with intravenous propofol and oxygen (O₂) support via endotracheal tube (FANTONI; CORTOPASSI, 2009). Blood collection was performed before the anesthetic procedure. During the chemical restraint of the animals, the ultrasound examination of the abdominal region and the collection of the urine sample by cystocentesis were performed.

The mode-B abdominal ultrasound examination was performed with the ACUSON NX3 ELITE/SIEMENS system and with multifrequency convex (CH5-2 from 2.0 to 5.0 MHz), microconvex (C8-5 from 3.1 to 8.8 MHz) and linear

(VF12-4 from 4.0 to 12.0 MHz) transducers. Liver evaluation was performed in at least two imaging planes, longitudinal and transverse. The anatomical-topographic relations, echogenicity, echotexture, contour, margin, shape, size and wall thickness were evaluated. B-mode image assessments were performed prior to the microbubble contrast technique.

The livers were evaluated by microbubble contrast ultrasonography with the ACUSON NX3 ELITE/SIEMENS machine. The specific inverted harmonic imaging software developed for use with contrast agents (Cadencia) was activated and the contrast agent used was sulfur hexafluoride (SonoVue®), in a single dose, rapidly infused into the cephalic vein through a 22G catheter, followed by 5 mL saline solution (0.9% sodium chloride). The images were obtained for five minutes, with a convex transducer (CH5-2 from 2.0 to 5.0 MHz) located in a window caudal to the xiphoid appendix, in a cross-sectional plane, in the area to be evaluated, and recorded in the equipment's storage system; these images were analyzed according to the presence or absence of microbubbles, vascular filling times from the time of contrast agent administration into the bloodstream until the start of organ perfusion (wash-in), arterial phase, total time for contrast agent to leave the parenchyma (wash-out) and peak contrast.

The data obtained were then subjected to analysis of variance and the means compared by Tukey test at 5% probability, using the Sisvar software (FERREIRA, 2011).

6.4 RESULTS

Homogeneous filling of the hepatic parenchyma was observed in all animals evaluated by microbubble contrast. The parameters evaluated in the liver by the ultrasound with a microbubble contrast agent were the time of vascular filling of the hepatic parenchyma (wash-in), arterial phase, total time for contrast agent to leave the parenchyma (wash-out) and peak contrast.

The mean time (seconds) for filling the hepatic parenchyma after the administration of microbubble contrast agent was 26.7 ± 7.36 , 34.2 ± 6.61 , 30 ± 1.58 , respectively for groups 1, 2 and 3. The mean wash-in time was shorter in

group 1 when compared to the means of groups 2 and 3 ($P < 0.05$) (Figure 7, 8 and 9).

Figure 7 - Giant anteater (Group 1) – Filling of the hepatic parenchyma by contrast agent (wash-in).



Source: personal archive.

Figure 8 - Anesthetized dog (Group 2) – Filling of the hepatic parenchyma by contrast agent (wash-in).



Source: personal archive.

Figure 9 - Non-anesthetized dog (Group 3) – Filling of the hepatic parenchyma by contrast agent (wash-in).



Source: personal archive.

The mean arterial phase in seconds was 14.3 ± 6.73 , 19.4 ± 3.84 and 20.4 ± 3.57 , respectively for groups 1, 2 and 3. The mean arterial phase time was shorter in group 1 when compared to the means of groups 2 and 3 ($P < 0.05$) (Figure 10, 11 and 12).

Figure 10 - Giant anteater (Group 1) – Arterial phase after contrast agent administration.



Source: personal archive.

Figure 11 - Anesthetized dog (Group 2) – Arterial phase after contrast agent administration.



Source: personal archive.

Figure 12 - Non-anesthetized dog (Group 3) – Arterial phase after contrast agent administration.



Source: personal archive.

The mean peak contrast time after the administration of the microbubble contrast agent (seconds) was 68.6 ± 8.73 , 59 ± 10.41 and 55 ± 8.51 , respectively for groups 1, 2 and 3. The mean peak contrast time was shorter in group 3 when compared to the means of groups 1 and 2 ($P < 0.05$) (Figure 13, 14 and 15).

Figure 13 - Giant anteater (Group 1) – Peak contrast of hepatic parenchyma after contrast agent administration.



Source: personal archive.

Figure 14 - Anesthetized dog (Group 2) – Peak contrast of hepatic parenchyma after contrast agent administration.



Source: personal archive.

Figure 15 - Non-anesthetized dog (Group 3) – Peak contrast of hepatic parenchyma after contrast agent administration.



Source: personal archive.

The mean time (seconds) for contrast agent to leave (wash-out) after administration was 247.5 ± 30.30 , 277.6 ± 68.9 and 236.6 ± 40.20 , respectively for groups 1, 2 and 3. The mean wash-out time was shorter in group 3 when compared to the means of groups 1 and 2 ($P < 0.05$) (Figure 16, 17 and 18) (Table 1).

Figure 16 - Giant anteater (Group 1) – Exit of contrast agent from the hepatic parenchyma (wash-out).



Source: personal archive.

Figure 17 - Anesthetized dog (Group 2) – Exit of contrast agent from the hepatic parenchyma (wash-out).



Source: personal archive.

Figure 18 - Non-anesthetized dog (Group 3) – Exit of contrast agent from the hepatic parenchyma (wash-out).



Source: personal archive.

Table 1- Time variables of arterial phase, wash-in, peak contrast and hepatic wash-out of the evaluated groups.

Group	AP (s)	WI (s)	PC (s)	WO (s)
1	14,3 ± 6,73 ^b	26,7 ± 7,36 ^b	68,6 ± 8,73 ^a	247,5 ± 30,30 ab
2	19,4 ± 3,84 ^a	34,2 ± 6,61 ^a	59 ± 10,41 ^b	277,6 ± 68,9 ^a
3	20,4 ± 3,57 ^a	30 ± 1,58 ^{s ab}	55 ± 8,51 ^b	236,6 ± 40,20 ^b

Superscript letters indicate statistical differences between the experimental groups (P<0.05). AP – Arterial phase; WI – wash-in; PC – Peak contrast; WO – washout.

6.5 DISCUSSION

Ultrasonography is the imaging technique of choice for screening patients with suspected hepatic lesions. However, due to the lack of contrast agents, ultrasound used to be less sensitive and specific compared to computed tomography and magnetic resonance imaging. With the advent of microbubble contrast agents, there has been an increase in diagnostic sensitivity and specificity (HOHMANN et al., 2003).

Ultrasound contrast agents began to be widely used in human medicine in several clinical situations, such as aiding in the detection of focal hepatic lesions, as the contrast agent presents a different behavior in relation to the normal parenchyma of the organ, due to the alteration of vascularization promoted by the disease. It is mainly used in the detection and characterization of focal hepatic lesions (BLOMLEY et al., 2001; QUAIA et al., 2004; NOLSØE; LORENTZEN, 2016). In veterinary medicine, this technique has been studied in several organs and in certain conditions, mainly in domestic animals (BURTI et al., 2020). In wild animal medicine, to date, there is no description of the use of microbubble contrast agents. After applying the contrast agent intravenously in anteaters, it was possible to evaluate the distribution of the agent in the liver, initially in the hepatic arteries, which crossed a capillary bed to reach the hepatic artery.

Nyman et al. (2005) evaluated the use of hepatic microbubble contrast agents in anesthetized and non-anesthetized dogs with a mean age of five years, mean weight of 6,9 Kg for the Dachshunds and 25,3 Kg for the Golden Retriever. According to the results obtained, there was a significant difference between anesthetized and non-anesthetized dogs in relation to the time to peak contrast, differing from what was observed in this study in relation to the group of dogs (groups 2 and 3), which showed no difference. However, data of dogs were statistically different from data of the anteaters evaluated in our study. According to the authors, the found difference can be explained by the use of propofol, as there is an increase in hepatic arterial blood flow and a reduction in systemic blood pressure, although it has no effect on cardiac output or portal venous flow. This difference was seen in smaller dogs (Dachshunds); however, the authors mention that the low number of animals studied did not allow a comparison with the larger dogs studied (Golden Retriever). This fact suggests that there may be an effect of breeds or body size of dogs on these evaluated parameters. Therefore, in the present study this difference was not observed, since the dogs presented similar size and body weight, a reason that may explain the obtained results.

Although, the difference found in this study between the groups of dogs and that of anteaters may have occurred due to factors inherent to the anteater, such as particularities of the anatomy and metabolism of the liver of these animals. Filling by contrast agent diminishes as it leaves the hepatic parenchyma through the caudal vena cava. The entry as well as the exit of the contrast agent from the parenchyma depends on homeostasis between the hepatic artery and the portal venous flow. Therefore, it is important to emphasize that the parameters evaluated in this study are dependent on the hemodynamics of the animal. Thus, these values can be affected by several variables such as gain setting, mechanical index, scan depth, animal body size and composition, metabolism, and the behavior of the individual contrast agent.

For this study, the second-generation contrast agent, SonoVue®, was chosen due to its properties such as lower solubility and greater diffusion capacity, which confer greater stability to the microbubbles and greater persistence in the circulation, being suitable for perfusion studies. Its elimination

occurs by the destruction of the phospholipid membrane and the elimination of sulfur hexafluoride gas via dissolution through pulmonary capillaries. Therefore, these evaluated indices can be used to estimate hemodynamic changes secondary to diseases. The contrast agent dose used was 0.05 ml/kg, both for anteaters and dogs, showing good filling of the evaluated organ, in addition to being safe for patients, corroborating with Nyman et al. (2005).

None of the animals in the three evaluated groups presented adverse reactions during this study as nausea, injection site reaction, hypotension, chest or lumbar pain, and respiratory distress (BRACCO, 2020), during or after administration of the contrast agent, as seen by Nyman et al. (2005).

Ziegler et al. (2003) evaluated the liver of eight healthy adult dogs, between 8 to 25 kg of body weight, with perfluoropropane contrast. Six dogs were anesthetized with propofol and two did not receive chemical restraint. The authors verified that both groups did not present differences regarding the parameters evaluated. It is worth mentioning that the contrast agent used was not the same as in this study, which may result in differences in the data obtained, since the perfluoropropane contrast agent can be absorbed by the reticuloendothelial system of the liver and may remain concentrated in the liver for a longer time. Considering the difference in currently available contrast agents, particularly regarding biodistribution, the results seen in the present study may be specific to SonoVue® contrast.

6.6 CONCLUSIONS

The ultrasound with a microbubble contrast agent can be used to assess hepatic perfusion in anteaters in a minimally invasive manner. Regarding the parameters evaluated, the arterial phase between anesthetized and conscious dogs were similar, except when compared with anteaters. This finding appears to be species specific.

The filling of the hepatic parenchyma by contrast agent was different for anteaters when compared to anesthetized dogs. As for the peak contrast, a difference was also observed between anteaters and dogs. It is noteworthy that

studies on the hepatic metabolism of the giant anteater would be necessary for a better understanding of the particularities related to this species.

This study can be used as a reference for anteaters in the assessment of hepatic perfusion using the SonoVue® contrast. SonoVue® contrast has been shown to be safe in both anteaters and dogs and the recommended dose for dogs can be used effectively in the giant anteater.

REFERENCES

BLOMLEY, M. J. K. et al. Microbubble contrast agents: a new era in ultrasound, **BMJ**, v. 322, p. 1222-1225, 2001.

BRACCO, **Sonovue**. 2020. Available in: <https://www.bracco.com/sites/default/files/2022-10/bula-sonovue-profissional-da-saude.pdf>. Access in: 15 set 2021.

BURTI, S. et al. Contrast-enhanced ultrasound features of malignant focal liver masses in dogs. **Scientific Reports**, p. 1-12, 2020.

CALLIADA, F. et al. Ultrasound contrast agent basic principles. **European Journal of Radiology**, v. 27, 157–160, 1998.

CARVALHO, C. F. et al. Elastography and Contrast-enhanced Ultrasonography in the Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in an Experimental Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 3, p. 96–101, 2013.

CHOI, S-Y. et al. Contrast enhanced ultrasonography of kidney in conscious and anesthetized beagle dogs. **Vet. Med. Sci.**, v. 78, n. 2, p. 239–244, 2016.

CORREAS, J. M. et al. Ultrasound contrast agents: properties, principles of action, tolerance, and artifacts. **Eur. Radiol.**, v. 11, p. 1316-1328, 2001.

DAR, M. D. et al. Contrast ultrasound imaging and its veterinary clinical applications. **Veterinary World**, v. 2, n. 7, p. 284-285, 2009.

FANTONI, D.T., CORTOPASSI, S.R.G. **Anesthesia in dogs and cats**. Second Edn. São Paulo: Roca, 2009.

FERRARA, K.; POLLARD, R.; BORDEN, M. Ultrasound Microbubble Contrast Agents: Fundamentals and Application to Gene and Drug Delivery. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 9, p. 415–447, 2007.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

FISHER, N. G. et al. Myocardial and microcirculatory kinetics of BR14, a novel third-generation intravenous ultrasound contrast agent, **JACC**, v. 39, n. 3, p. 530–537, February, 2002.

GRAMIAK, R. S. R. Echocardiography of the aortic root. **Invest. Radiol.**, v. 3, p. 356–366, 1968.

HOHMANN, J. A. et al. Ultrasonographic detection of focal liver lesions: increased sensitivity and specificity with microbubble contrast agents. **European Journal of Radiology**, v. 46, p. 147-159, 2003.

LEINONEN, M. **Contrast-enhanced ultrasound of abdominal organs in cats**. 78f. 2011. Academic Dissertation – Department of Equine and Small Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki - Helsinki, 2011.

LIN, Q. et al. Contrast-enhanced ultrasound for detection of traumatic splenic bleeding in a canine model during hemorrhagic shock and resuscitation. **Journal of Medical Ultrasound**, v. 21, p. 207-212, 2013.

MACRÌ, F. et al. Quantitative evaluation of canine urinary bladder transitional cell carcinoma using contrast-enhanced ultrasonography. **BMC Veterinary Research**, p. 1-8, 2018.

MILLER, A. P.; NANDA, N. C. Contrast echocardiography: new agents. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 30, n. 4, p. 425-434, 2004.

NAKAMURA, K. et al. Quantitative contrast-enhanced ultrasonography of canine spleen. **Vet. Radiol. Ultrasound.**, v. 50, n. 1, p. 104-108, Jan-Feb, 2009.

NAKAMURA, K. et al. Contrast-enhanced ultrasonography for characterization of focal splenic lesions in dogs. **J Vet Intern Med.**, v.24, p. 1290–1297, 2010.

NOLSØE, C. P., LORENTZEN, T. International guidelines for contrast-enhanced ultrasonography: ultrasound imaging in the new millennium. **Ultrasonography**, v. 35, p. 89-103, 2016.

NYMAN, H. T. et al. Contrast-enhanced ultrasonography in normal canine liver. Evaluation of imaging and safety parameters. **Vet. Radiol. Ultrasound**, v. 46, p. 243–250, 2005.

O'BRIEN, R. T. et al. Contrast harmonic ultrasound of spontaneous liver nodules in 32 dogs. **Vet. Radiol. Ultrasound**, v. 45, p. 547–553, 2004.

OHLERTH, S. et al. Contrast harmonic imaging of the normal canine spleen. **Vet Radiol Ultrasound.**, v. 48, n. 5, p. 451-456, Sep-Oct., 2007.

OHLERTH, S. et al. Contrast harmonic imaging characterization of canine splenic lesions. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 22, p. 1095–1102, 2008.

PINTO, C. A. V. **Contraste por microbolhas em ultrassonografia no diagnóstico diferencial entre oclusão e pseudo-occlusão da artéria carótida interna: correlação com a angiotomografia.** 85f. 2010. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Radiologia. São Paulo, 2010.

QUAIA, E. et al. Characterization of focal liver lesions with contrast-specific modes and a sulfur hexafluoride-filled microbubble contrast agent: diagnostic performance and confidence. **Radiology**, v. 232, p. 420-430, 2004.

ROSSI, F. et al. Effect of sedation on contrast-enhanced ultrasonography of the spleen in healthy dogs. **Vet. Radiol. Ultrasound**, v. 57, n. 3, p. 276–281, 2016.

UNGER, E. C. et. al. Therapeutic applications of microbubbles. **European Journal of Radiology**, v. 42, p. 160–168, 2002.

ZIEGLER, L.E. et al. Quantitative contrast harmonic ultrasound imaging of normal canine liver. **Vet. Radiol. Ultrasound**, p. 451-454, 2003.

WDOWIAK, M. Contrast-enhanced ultrasonography (CEUS) in canine liver examination. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 13, n. 4, p. 767-773, 2010.

WEST, G., HEARD, D., CAULKETT, N. Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia. Second edition. **Wiley-Blackwell**. Chapter 39, 533-537, 2007.

CAPÍTULO 7 - CONCLUSÃO

A técnica de elastografia descrita em cães pode ser aplicada com êxito no tamanduá bandeira, sendo uma ferramenta de grande auxílio na avaliação ultrassonográfica nesta espécie.

A ultrassonografia por contraste de microbolhas pode ser usada para avaliar a perfusão hepática dos tamanduás de forma minimamente invasiva. Quanto aos parâmetros avaliados, a fase arterial entre os cães anestesiados e conscientes foram semelhantes, exceto quando comparados com os tamanduás. Este achado parece ser espécie específico.

O preenchimento do parênquima hepático pelo contraste foi diferente para os tamanduás quando comparado aos cães anestesiados. Quanto ao pico de realce, também se observou diferença entre os tamanduás e os cães. Ressalta-se que estudos a respeito do metabolismo hepático do tamanduá bandeira seriam necessários para melhor compreensão das particularidades relacionadas a esta espécie.

Este estudo pode ser usado com referência para os tamanduás na avaliação da perfusão hepática na utilização do contraste SonoVue®. O contraste SonoVue® mostrou-se seguro tanto nos tamanduás como nos cães e a dose recomendada para os cães pode ser utilizada de forma eficaz no tamanduá bandeira.

APENDICE A – Local de execução

O estudo foi executado no Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique” do Centro Universitário de Rio Preto - UNIRP, no setor de Diagnóstico por Imagem (Figura 01).

Figura 1 – Setor de Diagnóstico por Imagem do Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique”.



A – Aparelho de ultrassonografia utilizado Acuson NX3 Elite – SIEMENS. B - Sala de ultrassonografia.
Fonte: Arquivo pessoal.

APENDICE B - Contenção física, química e transporte dos tamanduás.

Todos os animais permaneceram em jejum alimentar e hídrico de 12 horas. Os tamanduás pertencentes ao Zoológico Municipal de São José do Rio Preto-SP, foram contidos fisicamente com a ajuda de puçás, em seguida, sedados com cloridrato de cetamina (dose 10 mg/Kg por via intramuscular), juntamente com midazolam (0,3 mg/Kg por via intramuscular), sendo transportados de seus recintos ao Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique” do Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP (Figura 02), sendo submetidos a indução com propofol na dose de 1 mg/Kg por via intravenosa, manutenção anestésica com propofol por via intravenosa e suporte de oxigênio (O₂) a 100% via máscara (WEST; HEARD; CAULKETT, 2007).

Com os animais anestesiados, realizou-se o exame físico detalhado, a coleta das amostras de sangue para avaliação da saúde, o exame ultrassonográfico da região abdominal, no qual procedeu-se a coleta da amostra urinária por cistocentese.

Para proceder ao exame ultrassonográfico abdominal, em todos os animais (tamanduás e cães) foi necessário realizar uma tricotomia ampla utilizando máquina de tosa com lâmina nº 40 desde o apêndice xifoide, até a região hipogástrica, estendendo-se lateralmente, próximos ao último par de costelas, do lado esquerdo, e sobre os dois últimos pares de costelas, do lado direito, permitindo desta forma, uma boa avaliação dos órgãos abdominais.

Em seguida, procedeu-se ao exame ultrassonográfico o qual foi feito por um único avaliador, utilizando protocolo de varredura estabelecido em literatura (LOPES et al., 2015; ALBUQUERQUE, 2017). Para tal, colocou-se os animais em uma calha e por meio de contenção física (contidos pelos membros torácicos e pélvicos), com a cabeça próxima ao monitor e o corpo paralelo ao aparelho, permanecendo em decúbito dorsal e/ou lateral direito e/ou esquerdo, conforme a necessidade. A pele foi limpa com água e sabonete neutro e, após secagem, um gel específico foi aplicado para realizar o exame.

Durante todos os procedimentos, todos os animais passaram por monitoramento quanto aos parâmetros vitais (auscultação cardiorrespiratória,

pulso femoral e temperatura retal) pela equipe do Zoológico Municipal de São José do Rio Preto-SP (Figura 03) e do Setor de Atendimento Clínico-cirúrgico de Pequenos Animais do Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP (Figura 04).

Figura 2 – Transporte dos tamanduás sob efeito de sedação ao Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique”.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 3 – Monitoramento anestésico do tamanduá bandeira.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 4 – Monitoramento anestésico de um cão durante o exame ultrassonográfico.



Fonte: Arquivo pessoal.

APENDICE C - Coleta de amostras biológicas dos animais

Inicialmente, foi obtida uma amostra de sangue sem anticoagulante por meio da venopunção da veia jugular, safena ou cefálica no volume de 10 mL, sendo 2-3 mL armazenados em tubo apropriado contendo anticoagulante ácido etileno diaminotetracético a 10% (EDTA) para realização de hemograma completo e de 7-8 mL acondicionados em tubo sem anticoagulante (Vacutainer®), para os exames bioquímicos séricos. Tais tubos foram previamente identificados com dados de registro do paciente.

A amostra de sangue presente no tubo sem anticoagulante foi centrifugada imediatamente após a completa coagulação à 800G durante cinco minutos para a obtenção do soro. Após a obtenção do soro, foi feita a transferência, em frações de 1-2 mL, para microtubos tipo Eppendorf® identificados para proceder aos exames bioquímicos.

As amostras de urina foram obtidas por cistocentese guiada por ultrassonografia (Figura 05), as quais foram centrifugadas a 800 G por cinco minutos para confecção da lâmina com vista à sedimentoscopia. A obtenção da amostra fecal ocorreu por meio de sondagem retal, com auxílio de sonda uretral e seringa, onde aspirou-se o conteúdo fecal, condicionando em coletor universal estéril para proceder aos exames coproparasitológicos.

Figura 5 – Cistocentese em tamanduá bandeira.



Fonte: Arquivo pessoal.

APENDICE D - Análises laboratoriais

As análises laboratoriais hematológicas e bioquímicas ocorreram no Laboratório de Análises Clínicas e Microbiológicas do Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique”. As contagens globais de hemácias, leucócitos e plaquetas foram feitas por meio da contagem manual via câmara de Neubauer. Quanto ao hematócrito, procedeu-se por meio de centrifugação do sangue total em centrífuga de micro hematócrito. As amostras de soro foram processadas para determinação das concentrações de Creatinina, Uréia, Alanina aminotransferase, Fosfatase Alcalina, Aspartato aminotransferase, Proteína Total, Albumina, Triglicérides, Colesterol, Glicose, utilizando-se de Kits comerciais, sempre de acordo com as recomendações dos respectivos fabricantes.

Os aspectos físicos e químicos da urina foram avaliados por meio da macroscopia e com auxílio de fita comercial (seguindo as recomendações do fabricante), respectivamente, assim como a densidade urinaria, mensurada em refratômetro digital. A sedimentoscopia foi realizada com amostra fresca avaliada ao microscópio.

Para a avaliação da amostra fecal, realizou-se o método direto, no qual as fezes foram examinadas ao microscópio, diluídas em solução salina, objetivando a detenção de cistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos.