

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

**ULTRASSONOGRAFIA MODO B DE ALTA RESOLUÇÃO,  
MODO DOPPLER E USO DE CONTRASTE DE  
MICROBOLHAS NA AVALIAÇÃO TESTICULAR DE GATOS  
DOMÉSTICOS**

**Marina Botelho Soares de Brito  
Médica Veterinária**

**2015**

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

**ULTRASSONOGRAFIA MODO B DE ALTA RESOLUÇÃO,  
MODO DOPPLER E USO DE CONTRASTE DE  
MICROBOLHAS NA AVALIAÇÃO TESTICULAR DE GATOS  
DOMÉSTICOS**

**Marina Botelho Soares de Brito**

**Orientador: Prof. Dr. Marcus Antonio Rossi Feliciano**

**Co-orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente**

**Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal)**

**2015**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Marina Botelho Soares de Brito** – Nascida em Belém (PA), 02 de Janeiro de 1989. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural da Amazônia (2012). Possui Residência Veterinária em Obstetrícia Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal (2014). Tem experiência na área de Ultrassonografia e Fisiologia Reprodutiva. Atuando em Reprodução e Diagnóstico por Imagem de Animais Domésticos.

*Aos meus pais,  
Francisco e Mônica,  
Meus irmãos,  
Marcelo e Murilo,  
E meu amor,  
Leandro.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por ter um plano maravilhoso pra minha vida e permitir que eu curta cada pedacinho dele.

Aos meus pais Francisco e Mônica, e irmãos Marcelo e Murilo, por serem a melhor família que alguém poderia desejar. Se eu tivesse 10 chances de escolher, em todas elas eu escolheria vocês.

Ao meu noivo, Leandro, sem o qual eu jamais conseguiria ter chegado aqui. Meu maior incentivador, meu porto seguro, meu protetor. Esse trabalho é nosso.

Ao meu orientador Marcus Antonio Rossi Feliciano, por ser gente como a gente, tão parceiro, tão incentivador. Obrigada pela compreensão, carinho e amizade, sempre fazendo o impossível para o crescimento de todos.

Ao meu eterno orientador Wilter Ricardo Russiano Vicente, que me recebeu em Jaboticabal e deu início a todo esse processo. Obrigada pela credibilidade desde sempre e por querer ser sempre o pai de todos.

Aos meus amigos da vida de PG, Ana Paula, Vivian, Marjury, Ricardo, Roberta, Beatriz e Letícia, que embarcaram nessa jornada comigo, tornando muito mais prazerosa e gratificante.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa.

Ao Pedro Paulo e Eliandra, por todas as considerações na avaliação deste projeto, que certamente contribuíram muito para o engrandecimento do mesmo.

A todos os amigos que fiz no HV, com certeza não colhi apenas frutos profissionais. Vocês são pessoas únicas e ficarão pra sempre guardadas comigo.

Às minhas tias do coração, Dica e Cecé, que me acompanham desde pequena e ficam felizes com a minha felicidade.

Às minhas amigas Adryssa, Bianca, Mariana e Patrícia, por entender a distância e ter a certeza que os sonhos nos levam a caminhos diferentes, mas o amor vai fazer sempre estarmos presentes.

A minha irmã e colega de profissão, Claudia Rufino, por ser um pedaço de mim, por ser motivo de orgulho e inspiração.

Às minhas irmãs jaboticabalenses, Roberta e Vívian, por terem dividido comigo todos os sentimentos dessa experiência incrível. Por terem sido minha família e feito isso com tanto amor.

Acima de tudo, agradeço aos animais, fonte de amor inesgotável. Ainda tenho muito a aprender com vocês. Mel, você foi a melhor York que o mundo já conheceu, a melhor amiga que eu poderia ter.

A todos os animais que fizeram parte desse projeto.

A dona Suely, por se empenhar tanto em conseguir os animais e dar tanto amor a todos eles.

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

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT .....	10
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais .....	11
1. Introdução .....	11
2. Revisão de Literatura .....	12
2.1 Estruturas testiculares .....	12
2.2 Vascularização testicular .....	14
2.3 Ultrassonografia testicular .....	15
2.4 Ultrassonografia Doppler .....	17
2.5 Ultrassonografia por Contraste com Microbolhas .....	19
3. Referências.....	22
CAPÍTULO 2 – Doppler and Contrast-Enhanced Ultrasonography of Testicles in Adult Domestic Felines.....	26
Contents.....	26
Introduction .....	27
Material and Methods.....	28
Results .....	30
Discussion.....	33
Conclusion .....	35
References.....	36



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



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 11748/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Ultrassonografia modo B de alta resolução e Doppler testicular de gatos domésticos"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcus Antonio Rossi Feliciano está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de julho de 2014.

Jaboticabal, 07 de julho de 2014.

Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes  
Coordenadora – CEUA



## **ULTRASSONOGRAFIA MODO B DE ALTA RESOLUÇÃO, MODO DOPPLER E USO DE CONTRASTE DE MICROBOLHAS NA AVALIAÇÃO TESTICULAR DE GATOS DOMÉSTICOS**

**RESUMO** - As pesquisas envolvendo a reprodução de gatos domésticos comumente baseiam-se em análise macroscópica e andrológica do sistema reprodutor desses animais, não havendo nenhum estudo até o momento sobre a avaliação ultrassonográfica dos testículos nesta espécie. Sendo assim, este estudo prospectivo visou realizar a varredura ultrassonográfica dos testículos de 45 gatos adultos domésticos, utilizando as técnicas Modo B, Doppler e Ultrassonografia por Contraste com Microbolhas. Os resultados obtidos ao exame ultrassonográfico modo B demonstraram as estruturas testiculares com ecotextura homogênea e com ecogenicidade dentro da normalidade (semelhante à ecogenicidade do tecido esplênico), com presença de linha mediastinal evidente. Ao Doppler colorido testicular, foi possível verificar artéria testicular com padrão de ondas arterial e monofásico, em região de cordão espermático. Utilizando o Doppler Espectral, obtiveram-se os índices vasculares dos testículos direito e esquerdo, respectivamente: VS = 6.23 cm/s, VD = 2.77 cm/s e IR = 0.53; VS = 6.73 cm/s, VD = 2.8 cm/s e IR = 0.54. A avaliação ultrassonográfica contrastada por microbolhas não resultou em efeitos colaterais aos animais, apresentando-se de aplicação confiável e gerando imagens de qualidade. O contraste preencheu as estruturas vasculares subcapsulares, com moderado realce homogêneo do parênquima, além de rápida redução da ecogenicidade após o pico de realce. Os valores de tempo para o contraste de microbolhas, considerando tempo de entrada, pico de realce e tempo de saída para os testículos direito e esquerdo foram, respectivamente: tempo de entrada = 10.76 s, pico de realce = 21.50 s e pico de saída = 81.81; tempo de entrada = 8.78 s, pico de realce = 21.62 s e tempo de saída = 75.36. Esses exames foram facilmente aplicados em gatos domésticos e devem ser utilizados como técnicas auxiliares no diagnóstico de anormalidades testiculares nesta espécie.

**Palavras-chave:** felinos, testículo, ultrassom, microbolhas.

## **HIGH RESOLUTION B MODE, DOPPLER AND CONTRAST-ENHANCED ULTRASONOGRAPHY OF TESTICLES IN ADULT DOMESTIC FELINES**

**ABSTRACT** - Research involving breeding of domestic cats are commonly based on macroscopic and andrologic analysis, there is no study to date with sonographic evaluation of domestic cats testicle. Thus, this study aimed to perform the ultrasound scan of 45 adult domestic cats testicles, using the techniques of B mode, Triplex Doppler ultrasound and contrast-enhanced. The results showed homogeneous testicles, with normal echogenicity and echotexture, with evident mediastinal line. Testicular artery was observed in the spermatic cord with tortuous pattered and showed monophasic-patterned waves and low vascular resistance and with systolic peak evident. Values of indices vascular were as follows: SV = 6.73 cm/s, DV = 2.8 cm/s and RI = 0.54 for left testicles; and SV = 6.23 cm/s, DV = 2.77 cm/s and RI = 0.53 for right testicles. The contrast-enhanced resulted in no side effects, being reliable and generating quality images. Contrast filled the subcapsular vascular structures and after a few seconds, a homogeneous moderate enhancement of the parenchyma, with parenchymal vessels still distinguishable and after the peak phase, a rapid homogeneous decrease in echogenicity. Values of time for contrast-enhanced ultrasonography were as follows: wash-in = 8.78 s, peak enhancement = 21.62 s and wash-out = 75.36 for left testicles; and wash-in = 10.76 s, peak enhancement = 21.50 s and washout = 81.81 for right testicles. The examination in Doppler mode showed testicular artery with monophasic-patterned waves in spermatic cord. These tests were easily applied in domestic cats and should be used as auxiliary techniques in the diagnosis of testicular abnormalities in this species.

**Keywords:** felines, testicles, ultrasound, contrast-enhanced

## **CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais**

### **1. Introdução**

A crescente população de felinos domésticos no mundo não está proporcionalmente relacionada aos avanços nas pesquisas e ao conhecimento da medicina felina, principalmente ao que tange a reprodução de machos. Sabe-se que o estudo do sistema reprodutor de felinos machos e sua capacidade reprodutiva podem auxiliar em pesquisas sobre a fisiologia reprodutiva e patologias de mecanismos que envolvem a formação de gametas dos animais (FRANÇA & GODINHO, 2003).

A reprodução de felinos domésticos hoje está basicamente relacionada à qualidade do sêmen e a variabilidade individual das fêmeas adultas quanto ao padrão do ciclo estral. Dentre os aspectos, os machos tendem a ter seu comportamento hormonal estimulado pela presença da fêmea em estro (AXNER, 2008).

Observa-se em machos felinos uma variabilidade individual considerável quanto à qualidade espermática, gerando um desafio para a determinação de padrões de análise seminal e utilização desses animais como modelo para programas de reprodução assistida ou extrapolação para felinos selvagens, ameaçados de extinção ou animais de alto valor zootécnico (AXNER, 2008).

Os estudos em felinos domésticos e selvagens concentram-se na avaliação da morfometria testicular e determinação da espermatogênese, tais parâmetros são baseados na análise anatomohistológica (SIEMIENIUCH & WOCLAWEK-POTOCKA, 2007; NIE et al., 2002), sendo que até o presente momento não existem estudos para avaliar os testículos por meio do exame ultrassonográfico.

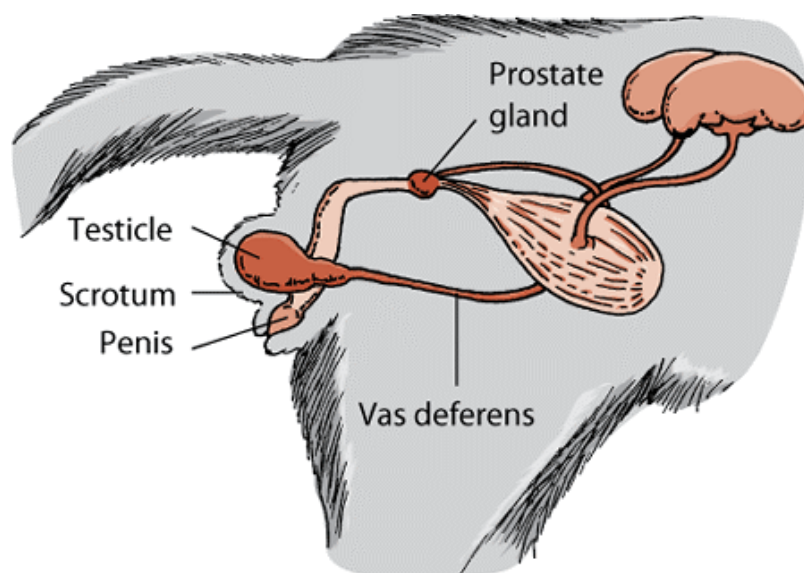
Considerando a novidade do uso da técnica de Doppler e ultrassonografia com contraste na avaliação testicular dos gatos, o objetivo deste estudo foi caracterizar os padrões vasculares do fluxo sanguíneo testicular de gatos adultos, por meio de parâmetros dopplerfluxométricos e pela utilização de contraste ultrassonográfico do tipo microbolhas.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1 Estruturas testiculares

O sistema reprodutor dos gatos domésticos é formado pelo pênis, escroto, dois testículos, dois epidídimos, próstata, duas glândulas bulbouretrais, ducto deferente, cordão espermáticos e uretra (DAVIDSON & BAKER, 2009).

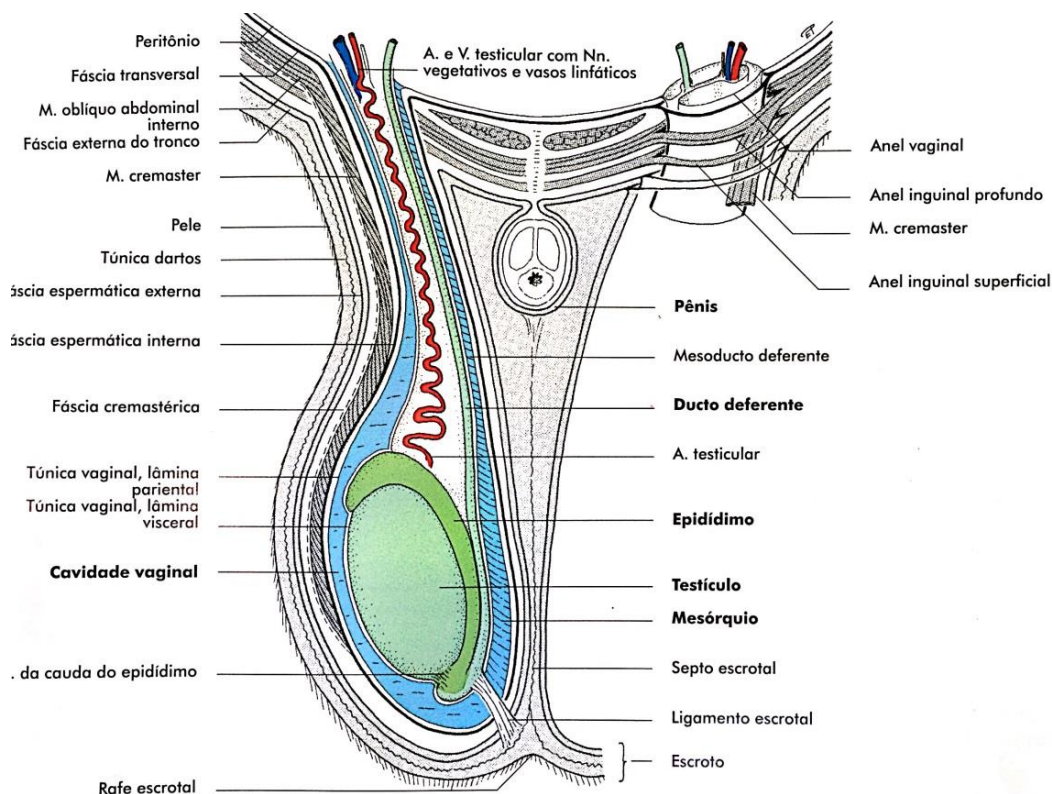
Os testículos são órgãos reprodutivos masculinos responsáveis pelas características sexuais primárias. A produção de gametas e hormônios na gônada masculina define a qualidade reprodutiva do animal, juntamente com outras características ambientais. Em felinos, os testículos tem formato ovoide a circular e estão localizados em região inguinal, no escroto, ventral ao ânus e dorsal ao prepúcio, não apresentando característica pendular (Figura 1).



**Figura 1.** Desenho esquemático representando a anatomia do sistema reprodutor masculino de gatos (Fonte: MANUAL MERCK, 2015).

As estruturas testiculares dos felinos possuem um revestimento complexo constituído por uma túnica serosa, túnica albugínea, fibras musculares na túnica dartos, pele e uma densa camada de pelos responsáveis dentre outras funções pela regulação térmica do órgão. Dentre as camadas de revestimento testicular, a túnica albugínea é diferenciada, sendo relativamente mais espessa do que em outras espécies domésticas. Ao redor dos testículos é possível verificar a presença dos

epidídeos, que percorrem a borda caudocranial dos testículos que tem a função de armazenar e maturar os espermatozoides, e deixam a bolsa escrotal ao se diferenciarem em ductos deferentes. Além dessas estruturas, o aporte sanguíneo para os testículos acontece por meio dos cordões espermáticos composto de vasos, ductos deferentes e nervos (Figura 2) (DAVIDSON & BAKER, 2009).



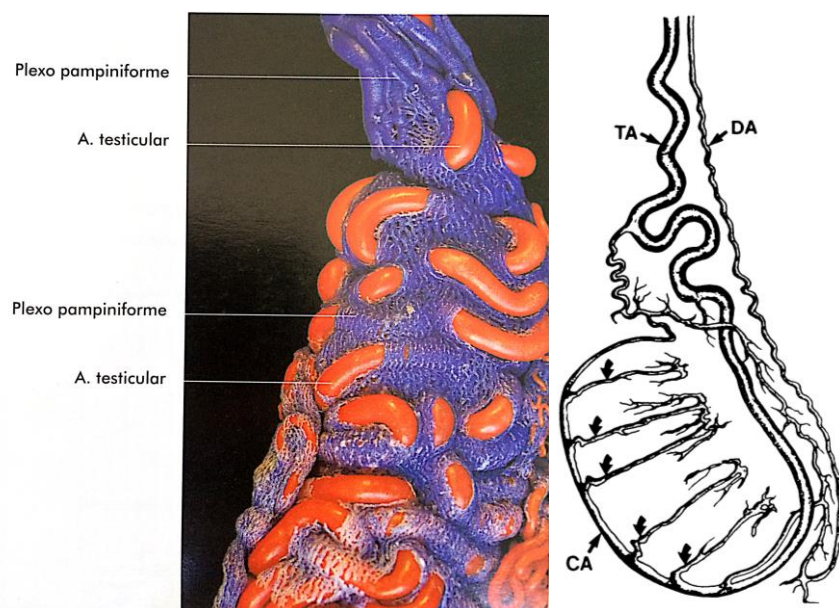
**Figura 2.** Imagem ilustrativa de esquema anatômico do testículo de mamíferos domésticos (Fonte: KÖNIG; LIEBICH, 2004).

Em felinos domésticos, os testículos atingem o seu diâmetro e conformação máxima e iniciam a espermatogênese, por volta dos oito meses de idade, sendo que animais abaixo de oito meses possuem apenas uma única camada de células de sustentação e poucas espermatogônias. O ápice reprodutivo de gatos domésticos ocorre entre 12 e 36 meses de vida, com maiores taxas de diferenciação do epitélio seminífero e de atividade da espermatogênese, culminando em maiores concentrações espermáticas quando comparado a outras faixas etárias (SIEMIENIUCH & WOCLAWEK-POTOCKA, 2007).

De acordo com França e Godinho (2003), o testículo de felinos adultos pesa em torno de 1,2 g, representando 0,08% da massa corporal, o que representaria um índice gonadossomático muito baixo. O estroma testicular estaria dividido de forma heterogênea entre túbulos seminíferos, que ocupam 90% do volume testicular, e 6% de células de Leydig, que formam a sustentação da rede testicular, responsável pela coleta dos espermatozoides e que forma os ductos deferentes. A produção espermática diária está estabelecida entre  $16 \times 10^6$  espermatozoides/dia por testículo e pode ter influência sazonal em zonas temperadas (AXNER, 2008).

## 2.2 Vascularização testicular

A vascularização testicular é caracterizada pela presença de vasos que compõem o plexo pampiniforme, presente no cordão espermático. Dentre estes, as principais artérias responsáveis pela irrigação dos testículos são as testiculares, além da artéria deferente, denominadas suprategesticulares, capsulares e intrategesticulares (Figura 3) e também as veias testiculares. As artérias testiculares são mais calibrosas e sofrem anastomoses ou se diferenciam em artérias capsulares e intrategesticulares (MIDDLETON et al., 1989). A vascularização testicular está envolta pela camada de tecido conjuntivo denominada túnica albugínea.



**Figura 3.** Imagem ilustrativa de esquema do plexo pampiniforme de animais domésticos. CA: Artéria capilar; DA: Artéria Deferente; TA: Artéria Testicular (Adaptado de MIDDLETON et al.1989 e KÖNIG & LIEBICH, 2004).

### 2.3 Ultrassonografia testicular

Os trabalhos destinados à avaliação testicular de felinos domésticos estão principalmente direcionados a avaliação histológica do tecido testicular e seminal (SIEMIENIUCH & WOCLAWEK-POTOCKA, 2007). Demais órgãos do sistema reprodutor, também estão pouco descritos na literatura quando avaliados por meio dos métodos de diagnóstico por imagem, como a avaliação radiográfica do osso peniano (PIOLA et al., 2011) e avaliações prostáticas (TUCKER & SMITH, 2008; ROURA et al., 2002; NEWELL et al., 1992). Porém, avaliações ultrassonográficas do testículo de gatos são ainda mais raras na literatura.

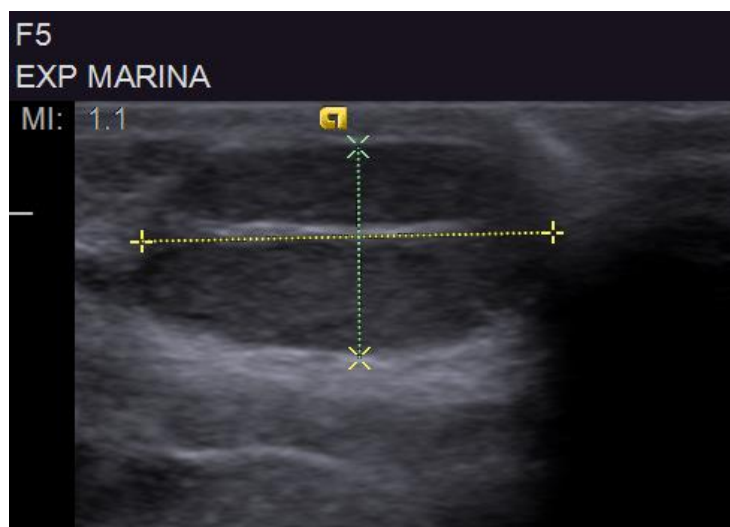
Como principal objetivo, o exame andrológico deve realizar a avaliação da fertilidade do macho felino, observando tanto a estrutura testicular como sua função. Dentre as várias avaliações aplicadas a este exame, a ultrassonografia pode auxiliar no diagnóstico de possíveis degenerações teciduais, anormalidades clínicas, alterações do desenvolvimento, ectopia e vascularização do tecido testicular (JOHNSTON et al., 1991).

O exame ultrassonográfico dos testículos deve ser realizado após tricotomia da região escrotal (FELICIANO et al., 2013) pelo contato direto do transdutor com a superfície do órgão em interface com o gel condutor ou utilizando *stand-off*. As frequências dos transdutores devem ser em torno de 7,5 a 18 MHz (DAVIDSON & BAKER, 2009; JOHNSTON et al., 1991).

Para a varredura testicular, devem-se realizar dois planos de corte ultrassonográfico: transversal e longitudinal. Ademais, o estroma, pela observação da ecogenicidade (similar a do baço), ecotextura homogênea e a presença de uma fina linha hiperecogênica central, denominada de mediastino testicular. É possível observar dentro da bolsa escrotal, a cauda e cabeça do epidídimo, caracterizado como mais hipoecogênicas que o estroma testicular (Figura 4). Deixando a bolsa testicular para adentrar a cavidade abdominal podemos observar cranialmente aos

testículos, o cordão espermático e o tortuoso plexo pampiniforme (FELICIANO et al., 2013).

Segundo Davidson e Baker (2009), o exame ultrassonográfico dos testículos de felinos domésticos foi útil para avaliação da morfologia normal, das medidas de volume e diâmetro testicular, assim como a detecção de distrofias e anomalias do estroma testicular e das estruturas adjacentes, presentes no escroto (DAVIDSON & BAKER, 2009).



**Figura 4.** Imagem ultrassonográfica de testículo normal de gato doméstico demonstrando ecotextura homogênea e linha hiperecogênica central (mediastino testicular) (*Arquivo pessoal*).

Em cães, o desenvolvimento de técnicas ultrassonográficas para acessar os órgãos da reprodução e de ferramentas auxiliares para o diagnóstico de enfermidades são bem descritas na literatura veterinária, porém em felinos, muito em função da condição rara de algumas afecções, não existe uma literatura consolidada neste certame. Alguns relatos descrevem a ocorrências de doenças prostáticas, como neoplasias, cistos paraprostáticos e prostatites (POINTER & MURRAY, 2011; ROURA et al., 2002; NEWELL et al., 1992).

As neoplasias testiculares também são raras em gatos, assim como em caninos, e podem ser diagnosticadas por meio da ultrassonografia. Existem na literatura escassos relatos sobre as ocorrências de tumores de células de Leydig, células intersticiais e de Sertoli, sendo este último o mais recorrente, principalmente



em casos de criptorquidismo (ASPRONI et al., 2013; TUCKER & SMITH, 2008; BENAZZI et al. 2004).

## **2.4 Ultrassonografia Doppler**

Dentre os recentes avanços na tecnologia dos equipamentos de ultrassonografia, um deles tem tomado lugar de destaque na avaliação da função de vários órgãos, o modo Doppler cuja técnica tem ajudado a elucidar em tempo real a característica de irrigação de órgãos parenquimatosos como o tecido testicular (CARRILLO et al., 2012).

Diversos trabalhos sobre o uso do Doppler já foram realizados em diferentes espécies de animais domésticos e selvagens. Tal avaliação é utilizada para avaliação da perfusão testicular e por isso auxiliam no diagnóstico de afecções relacionadas à vascularização testicular (MIDDLETON et al., 1989).

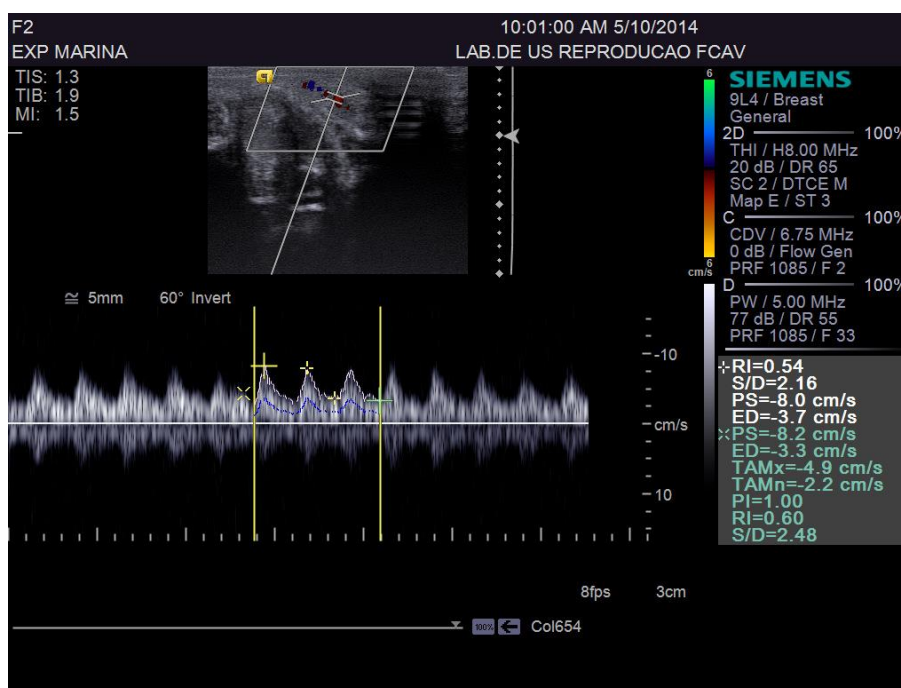
Em humanos, casos de infertilidade e de alterações como a varicocele e torções testiculares são rotineiramente avaliados pelo Doppler (SCHURICH et al., 2009). Souza et al. (2014) descrevem as diversas espécies já estudadas por meio do Doppler, sendo que os trabalhos abordam de maneira mais sistemática o cão.

Em contraste ao que se tem de aplicação da técnica Doppler e sua importância na clínica de animais de companhia, não existem estudos envolvendo o uso da tecnologia na avaliação dos testículos de gatos, ou seja, não há descrição dos principais achados e características vasculares estudadas pela técnica, os quais podem permitir sua utilização para detecção precoce de alterações reprodutivas (SILVA et al., 2012).

A ultrassonografia doppler das artérias testiculares nas espécies descritas na literatura inicia-se pela avaliação em modo B e sua posterior associação com a detecção dos leitos vasculares por meio do Doppler colorido e pulsado (Figura 5). Esta avaliação permite a determinação de parâmetros vasculares que caracterizam o fluxo da artéria testicular (GÜNZEL-APEL et al., 2001), assim como pode ser realizado comparativamente com vasos intratesticulares (SOUZA et al., 2014).

Os parâmetros Doppler investigados são denominados de índices dopplervelocimétricos: velocidade do pico sistólico (VPS); velocidade diastólica (VD); o índice de resistência vascular ( $IR = V_{max} - V_{min} / V_{max}$ ); e de pulsatividade ( $IP =$

Vmax – Vmin/Vmédia), sendo que estes devem ser obtidos sob condições de angulação entre o feixe ultrassonográfico e o fluxo vascular (ângulo de insonação menor a 60°) e com adequação do caliper ao diâmetro do vaso, de forma a permitir que a amostra doppler contemple uma região central do vaso, evitando a turbulência dos bordos vasculares, três espectros similares devem ser levados em consideração para a aquisição de uma média que caracterize o fluxo sanguíneo (CARVALHO et al., 2008; GUMBSCH et al., 2002; MIDDLETON et al., 1989).



**Figura 5.** Imagem ultrassonográfica Doppler da artéria testicular de gato doméstico (Arquivo pessoal).

Em cães e humanos, os índices dopplervelocimétricos da artéria testicular já foram descritos (SOUZA et al., 2014; MIDDLETON et al., 1989). Em caninos, observa-se a presença de ondas espectrais de baixa pulsatividade e resistência na artéria testicular, o que seria um padrão típico de órgãos com fluxo sanguíneo intenso (CARVALHO et al., 2008). Diante disso, picos sistólicos amplos e contínuos, com observação de todo o ciclo cardíaco são fisiologicamente esperados durante o exame testicular de cães adultos saudáveis. Animais jovens por sua vez, tendem a possuir apenas a fase sistólica e inibir a diástole no Doppler espectral, devido a não

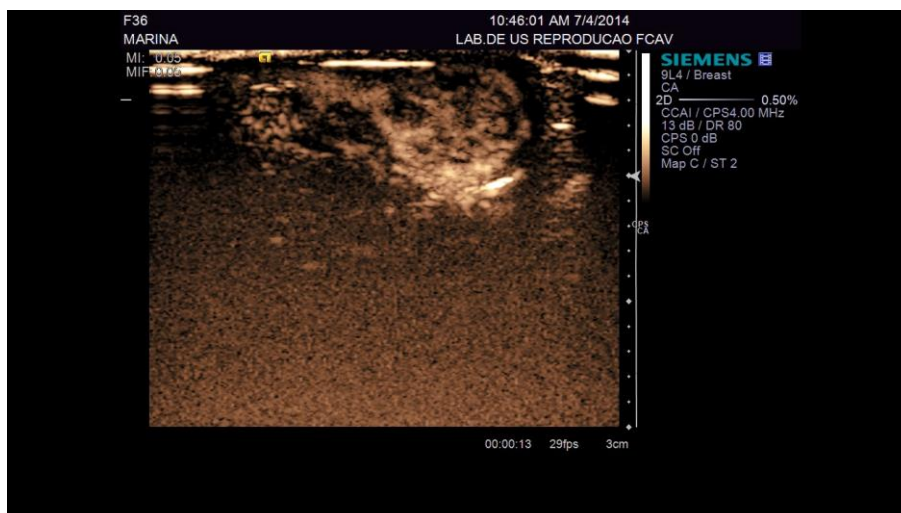
maturação da gônada em período pré-pubere (WOOD et al., 2010; GÜNZEL-APEL et al., 2001).

## **2.5 Ultrassonografia por Contraste com Microbolhas**

Os contrastes ultrassonográficos (CEUS – “Contrast Enhanced Ultrasonography”) são ferramentas diagnósticas recentes em pesquisa e rotina da medicina veterinária, tornando a realização dos diagnósticos mais seguros e sofisticados, no que diz respeito a alterações em diversos órgãos que estejam acometidos por afecções com consequências na perfusão vascular, como é o caso das neoplasias (NYMAN et al., 2005).

O principal contraste utilizado é o hexafluoreto de enxofre, um agente de contraste capaz de se manter estável dentro da circulação sanguínea, sem deixar o leito vascular, além de apresentar grande capacidade de se manter por longo período na circulação em função da sua baixa solubilidade em água e moléculas gasosas de alto peso molecular, tendo grande resistência em relação a pressão externa e excelente tolerância ao organismo animal (VOLTA et al., 2014). Sua eliminação se dá pelo pulmão (80-100%) (NYMAN et al., 2005). Os contrastes têm baixa capacidade de promover reações adversas, sendo descrito, quando observadas, reações em humanos como cefaleias, náuseas e sensação de calor (HAERS; SAUNDERS, 2009), e em animais como síncope e vômitos até 24 horas após a administração de CEUS (SEILER et al., 2013).

O princípio físico da detecção das microbolhas está na detecção do sinal não linear produzido por bolhas de diferentes tamanhos, presentes em frações de sangue, que ao entrar em contato com o feixe de ultrassom, geram frequências denominadas de harmônicas (Figura 7). A grande quantidade e oscilação das microbolhas em determinada região de varredura ultrassonográfica gera um forte contraste na superfície do órgão sob estudo quando visualizado na tela do equipamento, permitindo assim a detecção de microvascularizações que antes não eram percebidas, mesmo durante o exame em Doppler Amplitude (NYMAN et al., 2005).



**Figura 7.** Imagem ultrassonográfica de testículo felino, utilizando a ultrassonografia contrastada por microbolhas. (*Arquivo pessoal*).

Este exame contrastado define parâmetros relacionados ao preenchimento homogêneo ou heterogêneo dos órgãos pelas microbolhas, mas principalmente de áreas nodulares específicas no interior dos tecidos, podendo-se então definir padrões de intensidade: mais intensos - “hyperenhanced”; “isoenhanced”, em que não se diferencia a massa do tecido adjacente utilizando o contraste; e padrões de pouca intensidade - “hypoenhanced” (VOLTA et al., 2014).

Adicionalmente podem ser avaliados utilizando o CEUS: os tempos de preenchimento vascular desde a injeção dos contrastes na corrente sanguínea até o início da perfusão do órgão (“wash-in”); o pico de contraste (realce), que é momento de maior perfusão após o “wash in”; e tempo de saída total do contraste do parênquima (“wash-out”). Esse padrão de preenchimento microvascular tem substancial valia para a determinação precoce de pequenas massas em estágio inicial de evolução e de hipervascularização em tumores agressivos, podendo auxiliar na diferenciação entre tumores malignos e benignos, de forma não-invasiva (LOCK et al., 2009).

Em Medicina, a técnica CEUS é superior às diversas técnicas diagnósticas, como a Tomografia Computadorizada Contrastada e a Ressonância Magnética Contrastada, no que cerne a avaliação de nódulos focais de órgãos parenquimatosos; além de ser uma técnica que não exige a anestesia do paciente, promove avaliação em tempo real, e possui um custo inferior na execução do exame

e na compra do equipamento, além de ser totalmente livre de radiações ionizantes. Quando comparada a citologia por meio da Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) na determinação de malignidade de lesões nodulares, possui alta especificidade (HAERS & SAUNDERS, 2009).

O uso do contraste microbolhas já foi descrito para humanos para a avaliação hepática, renal, órgãos reprodutivos e até para o estudo de refluxo vesico-uretrais (EFSMUB, 2008). Em animais domésticos, são poucos os estudos, sendo realizados em cães e gatos para avaliação do pâncreas e linfonodos (HAERS & SAUNDERS, 2009), baço (ROSSI et al., 2008; OHLERTH et al., 2007), fígado (O'BRIEN et al., 2004), (NYMAN et al., 2005), rins (HAERS et al., 2010), próstata (VIGNOLI et al., 2011) e testículos (VOLTA et al., 2014).

No caso de neoplasias, lesões que possuem perfusão diferente das áreas de tecidos saudáveis serão destacadas de forma diferente pelos CEUS (LOCK et al., 2009); assim como as massas testiculares tem especial importância, devido a limitada fonte de informações que podem ser obtidas quanto a invasividade de tumores nessa região, já que exames envolvendo as técnicas ultrassonográficas em Modo B ou Doppler tem pouco sensibilidade e especificidade quando comparados a técnica de contraste utilizando microbolhas (HAERS & SAUNDERS, 2009).

A avaliação por meio de parâmetros dopplerfluxométricos e pela utilização de contraste ultrassonográfico do tipo microbolhas constitui ferramenta ainda pouco utilizada na avaliação clínica de felinos. Novas perspectivas para o diagnóstico e tratamento reprodutivo, principalmente relacionadas a alterações testiculares devem ser alcançadas com a padronização das técnicas de ultrassonografia avançada.

### 3. Referências

- ASPRONI, P.; MILLANTA, F.; LORENZI, D. & POLI, A. A Leydig Cell Tumour in a Cat: Histological and Immunohistochemical Findings. **Case Reports in Veterinary Medicine**, pp. 1-3, 2013.
- AXNER, E. Updates on Reproductive Physiology, Genital Diseases and Artificial Insemination in the Domestic Cat. **Reproduction in Domestic Animals**, pp. 144-149, 2008.
- BENZAZZI, C.; SARLI, G. & BRUNETTI, B.. Sertoli Cell Tumour in a Cat. **Journal of Veterinary Medicine**, pp. 124-126, 2004.
- CARRILLO, J.; SOLER, M.; LUCAS, X. & AGUT, A.. Colour and Pulsed Doppler Ultrasonographic Study of the Canine Testis. **Reproduction in Domestic Animals**, pp. 655-659, 2012.
- CARVALHO, C.; CHAMMAS, M. & CERRI, G.. Princípios físicos do Doppler em ultrassonografia. **Ciência Rural**, pp. 872-879, 2008.
- DAVIDSON, A. P. & BAKER, T. W.. Reproductive Ultrasound of the Dog and Tom. **Topics in Companion Animal Medicine**, pp. 64-70, 2009.
- Guidelines and Good Clinical Practice recommendations for Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS) . **European Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology**, pp 33-59, 2008.
- FRANÇA, L. R. & GODINHO, C. L.. Testis Morphometry, Seminiferous Epithelium Cycle Length, and Daily Sperm Production in Domestic Cats (*Felis catus*) . **Biology of Reproduction**, pp. 1554-1561, 2003.
- FELICIANO, M. A. R.; OLIVEIRA, M. E. F. & VICENTE, W. R. R.. **Ultrassonografia na reprodução animal**. 208pp, 2013.
- GUMBSCH, P.; GABLER, C. & HOLZMANN, A.. Colour-coded duplex sonography of the testes of dogs. **Veterinary Record**, pp. 140-144, 2002.
- GÜNZEL-APEL, A.; MÖHRKE, C. & NAUTRUP, C.. Colour-coded and pulsed Doppler sonography of the canine testis. epididymis and prostate gland:

Physiological and pathological findings. **Reproduction in Domestic Animals**, pp. 236-240, 2001.

HAERS, H. & SAUNDERS, J. H. Review of clinical characteristics and applications of contrast-enhanced ultrasonography in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, pp. 460-470, 2009.

HAERS, H.; VIGNOLI, M.; PAES, G.; ROSSI, F.; TAEYMANS, O.; DAMINET, S. ET AL., Contrast harmonic ultrasonographic appearance of focal space-occupying renal lesions. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, pp. 516-522, 2010.

JOHNSTON, G. R.; FEENEY, D. A.; RIVERS, B. & WALTER, P. A.. Diagnostic Imaging of the Male Canine Reproductive Organs: Methods and Limitations. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, pp. 553-589, 1991.

LOCK, G.; SCHMIDT, C.; HELMICH, F.; STOLLE, E. & DIECKMANN, K.-P. Early Experience With Contrastenhanced Ultrasound in the Diagnosis of Testicular Masses: A Feasibility Study. **Urology**, pp. 1049-1053, 2009.

MIDDLETON, W. D.; THORNE, D. A. & MELSON, G. L. Color Doppler Ultrasound of Normal Testis. **American Journal of Roentgenology**, pp. 293-297, 1989.

NEWELL, S.; MAHAFFEY, M.; BINHAZIM, A. & GREENE, C.. Paraprostatic cyst in a cat. **Journal of Small Animal Practice**, pp. 399-401, 1992.

NEWELL, S.; MAHAFFEY, M.; BINHAZIM, A. & GREENE, C.. Paraprostatic cyst in a cat. **Journal of Small Animal Practice**, pp. 399-401, 1992.

NIE, R.; ZHOU, Q.; JASSIM, E.; SAUNDERS, P. & HESS, R.. Differential expression of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the reproductive tracts of adult male dogs and cats. **Biology of Reproduction**, pp. 1161-1168, 2002.

NYMAN, H. T.; KRISTENSEN, A. T.; KJELGAARD-HANSEN, M. & MCEVOY, F. J. Contrast-enhanced ultrasonography in normal canine. **Vet Radiology and Ultrasound**, pp. 243-250, 2005.

O'BRIEN, R.; IANI, M.; MATHESON, J.; DELANEY, F. & YOUNG, K.. Contrast harmonic ultrasound of spontaneous liver nodules in 32 dogs. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, pp. 547-533, 2004.

OHLERTH, S.; RÜEFLI, E.; POIRIER, V.; ROOS, M. & KASER-HOTZ, B.. Contrast harmonic imaging of the normal canine spleen. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, pp. 451-456, 2007.

PIOLA, V.; POSCH, B.; AGHTE, P.; CAINE, A. & HERRTAGE, M.. Radiographic characterization of the penis in the cat. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, pp. 270-272, 2011.

POINTER, E. & MURRAY, L.. Chronic Prostatitis, Cystitis, Pyelonephritis, and balanoposthitis in a cat. **Journal of the American Animal Hospital Association**, pp. 258-261, 2011.

ROSSI, F.; LEONE, V.; VIGNOLI, M.; LADDAGA, E. & TERRAGNI, R.. Use of contrast-enhanced ultrasound for characterization of focal splenic lesions. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, pp. 154-164, 2008.

ROURA, X.; CAMPS-PALAU, M. A.; LLORET, A.; GARCIA, F. & ESPADA, I.. Bacterial Prostatitis in a Cat. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, pp. 593-597, 2002.

SCHURICH, M.; AIGNER, F.; FRAUSCHER, F. & PALLWEIN, L.. The role of ultrasound in assessment of male fertility. **European Journal of Obstetrics and Gynecology**, pp. 192-198, 2009.

SEILER, G. S.; BROWN, J. C.; REETZ, J. A.; TAEYMANS, O.; BUCKNOFF, M.; ROSSI, F. ET AL.. Safety of contrast-enhanced ultrasonography in dogs and cats: 488 cases (2002–2011). **Journal of American Veterinary Medical Association**, pp. 1255-1259, 2013.

SIEMIENIUCH, M. J. & WOCLAWEK-POTOCKA, I.. Morphological Features of The Seminiferous Epithelium in Cat (*Felis catus*, L. 1758) Testes. **The Japanese journal of animal reproduction**, pp. 1125-1130, 2007.

SILVA, L. D.; SOUZA, M. B.; BARBOSA, C. C.; PEREIRA, B. S.; MONTEIRO, C. L. & FREITAS, L. A.. Ultrassonografia bidimensional e Doppler para avaliação do trato reprodutor de pequenos animais. **Ciência Animal**, pp. 339-353, 2012.

SOUZA, M. B.; BARBOSA, C. C.; PEREIRA, B. S.; MONTEIRO, C. L.; PINTO, J.; LINHARES, J. ET AL.. Doppler velocimetric parameters of the testicular artery in healthy dogs. *Research and Veterinary Science*, pp. 533-536, 2014.

SOUZA, M. B.; MOTA FILHO, A. C.; SOUSA, C. V.; MONTEIRO, C. L.; CARVALHO, G. G.; PINTO, J. N. ET AL.. Triplex Doppler evaluation of the testes in dogs of different sizes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, pp. 1135-1140, 2014.



TUCKER, A. & SMITH, J.. Prostatic Squamous Metaplasia in a Cat with Interstitial Cell Neoplasia in a Retained Testis. **Veterinary Pathology**, pp. 905-909, 2008.

VIGNOLI , M.; RUSSO, M.; CATONE, G.; ROSSI, F.; ATTANASI, G.; TERRAGNI, R. ET AL.. Assessment of vascular perfusion kinetics using contrast-enhanced ultrasound for the diagnosis of prostatic disease in dogs. **Reproduction of Domestic Animals**, pp. 209-213, 2011.

VOLTA, A.; MANFREDI, S.; VIGNOLI, M.; RUSSO, M.; ENGLAND, G.; ROSSI, F. ET AL.. Use of Contrast-Enhanced Ultrasonography in Chronic Pathologic Canine Testes. **Reproduction in Domestic Animals**, pp. 202-209, 2014.

WOOD, M. M.; ROMINE, L. E.; LEE, Y. K.; RICHMAN, K. M.; O'BOYLE, M. K.; PAZ, D. A. ET AL.. Spectral Doppler signatures waveforms in ultrasonography. **Ultrasound Quartely**, pp. 83-99, 2010.

## CAPÍTULO 2 – Doppler and Contrast-Enhanced Ultrasonography of Testicles in Adult Domestic Felines.

### Reproduction in Domestic Animals

Reprod Dom Anim doi: 10.1111/rda.12557  
ISSN 0936-6768

#### Doppler and Contrast-Enhanced Ultrasonography of Testicles in Adult Domestic Felines

MBS de Brito<sup>1</sup>, MAR Feliciano<sup>1</sup>, LN Coutinho<sup>2</sup>, RR Uscategui<sup>1</sup>, APR Simões<sup>1</sup>, MC Maronezi<sup>1</sup>, VT de Almeida<sup>1</sup>, RM Crivelaro<sup>1</sup>, B Gasser<sup>1</sup>, L Pavan<sup>1</sup> and WR Russiano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Reproduction, College of Agricultural and Veterinary Sciences, Sao Paulo State University, Jaboticabal, Brazil; <sup>2</sup>Sector of Image Diagnostic, Federal University of the Para, Belem, Brazil

#### Contents

The objective was to characterize the vascular patterns of testicular blood flow of adult cats, measuring the systolic velocity (SV), diastolic velocity (DV), resistance index (RI), gate time (wash-in) peak enhancement and output time (wash-out) of the contrast and addition of tissue fill characteristics. Forty- five adult cats were selected, and the echotexture, echogenicity, size, contours and margins of testicles were assessed via ultrasound. By Doppler were evaluated the blood flow and determined of vascular index in testicular artery (SV, DV and RI) and via contrast-enhanced ultrasonography determine the time for phases: wash-in, wash-out and peak enhancement. Sonographic findings presented normal. Testicular artery was observed in the spermatic cord with tortuous patten and showed monophasic-patterned waves and low vascular resistance and with systolic peak evident. Values of indices vascular were as follows: SV = 6.73 cm/s, DV = 2.8 cm/s and RI = 0.54 for left testicles; and SV = 6.23 cm/s, DV = 2.77 cm/s and RI = 0.53 for right testicles. Contrast filled the subcapsular vascular structures and after a few seconds, a homogeneous moderate enhancement of the parenchyma, with parenchymal vessels still distinguishable and after the peak phase, a rapid homogeneous decrease in echogenicity. Values of time for contrast-enhanced ultrasonography were as follows: wash-in = 8.78 s, peak enhancement = 21.62 s and wash-out = 75.36 for left testicles; and wash-in = 10.76 s, peak enhancement = 21.50 s and washout = 81.81 for right testicles. Doppler and contrast-enhanced ultrasonography of the testicles in healthy adult cats was easily implemented and may provide baseline data for this

organ to allow the use of these techniques as a diagnostic tool for evaluating testicular abnormalities in sick cats.

## **Introduction**

The testicles are the male sex organs whose function is the production of sperm and sex hormones, especially testosterone (Feldman and Nelson 1987). The use of ultrasound to determine the normal range of male gonads and to detect the testicular disorders is important for the early diagnosis of diseases and for the selection of breeding and maintenance of domestic and wild feline species (Domingos and Salomão 2011).

Among the imaging methods for the evaluation of animal reproductive system, the B-mode ultrasonography in testicular animals allows the determination of biometric values such as size and volume, assessment of topographic and parenchymal features, position and its internal constitution (Brandão et al.,2006). In cats, the testes are easily located by ultrasound within the scrotum, showing uniform echotexture and echogenicity similar to the spleen (Davidson and Tomas 2009).

Doppler ultrasound method allows to study the anatomical features of the vessels and their functional characteristics related to vessel blood flow and functional data for blood flow (presence or absence, direction and flow velocity) (De Souza et al.,2014). In medicine, testicular Doppler is routinely used to determine the blood flow of the testicular artery, the diagnosis of testicular diseases and the study of spermatogenesis (Pinggera et al.,2008). In veterinary science, few studies are available with reports on the evaluation of stallions testicles (Pozor and McDonnell 2004) and dogs (Carrillo et al.,2012; Zelli et al.,2013), and few studies, with no reports on its use in the evaluation of cats.

The microbubble ultrasound contrast is a new technique in veterinary science. It uses contrast media of encapsulated inert structures, highly reflected by the apparatus that improve the colour and spectral Doppler signal (King 2006). In humans, this technique has already been used for the diagnosis of diseases affecting the testes; when ultrasound findings are inconclusive, this technique is used to obtain a higher degree of diagnostic accuracy (Souza and Silva 2014). In animals, the first study on the use of the technique was performed in dogs (Volta et al.,2014) in the

evaluation of males with scrotal abnormalities; there are no studies on the technique in other species.

Considering the novelty of using the Doppler technique and contrast-enhanced ultrasonography in testicular evaluation of cats, the aim of this study was to characterize the vascular patterns of testicular blood flow of adult cats, measuring the systolic velocity (SV), diastolic velocity (DV), resistance index (RI), gate time (wash-in) peak enhancement and output time (washout) of the contrast-enhanced ultrasonography and addition of tissue fill characteristics (homogeneous and heterogeneous).

### **Material and Methods**

This study was conducted following the approval of the Animal Ethics and Welfare Committee of the Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal, Brazil (protocol no 018.897/13). Forty-five adult, male, domestic, shorthair cats, 3–5 years of age (mean age = 4 ± 0.78 years) and weighing between 2.7 and 4.9 kg (mean = 3.82 ± 0.7 kg), were selected for this study. General and specific physical examinations (inspection of the scrotum and testicular palpation) were performed on all animals to determine which animals were healthy and met the inclusion criteria of the study.

After the animals were selected, the scrotal sac was clipped for ultrasonography. Before the examination, gel was applied for the ultrasound. No sedation was needed.

The ultrasonography was performed by a single evaluator experienced in ultrasonographic examinations. B-mode ultrasonography was performed with a 9.0-MHz linear transducer using ACUSON S2000/SIEMENS ultrasound equipment (Siemens, Munich, Germany). The echotexture (homogeneous or heterogeneous), echogenicity (hypo-, hyperechoic or mixed) of the parenchyma, size (increased, decreased or normal), contours and margins (regular or irregular) of the testicles (right and left) were assessed and categorized via B-mode ultrasound in longitudinal and transverse sections.

Doppler analysis was performed after locating the largest and possibly longitudinal or oblique section of testicular artery, and the angle between the Doppler

beam and the long axis of the vessel never was over 60°. Colour gain was adjusted to reduce the excessive colour noise when blood flows were too slow. A gate between 2 and 3 mm (equivalent to 2/3 of the vessel's diameter) was positioned in a central area of the vessel with apertures to measure the spectral trace of flow, spectral curve and vascular index, which was obtained automatically following software identification of the ultrasonic scanner for each waveform. A minimum of three subsequent waves were obtained to perform its evaluation. The parameters studied in the testicular artery were SV (cm/s), DV (cm/s) and resistive index ( $RI = (V_{max} - V_{min}) / V_{max}$ ).

For contrast-enhanced ultrasonography was used the same ultrasound machine with harmonic imaging software developed for use with contrast media (Cadence) and convex transducer 9 MHz with Harmonic ultrasound system. The images were evaluated after the exams, verifying the tissue filling by the contrast-enhanced ultrasonography (homogeneous or heterogeneous), and determine the time for incoming phases (wash-in), output (wash-out) and peak enhancement of contrast-enhanced ultrasonography in testicular tissues (Takeda et al., 2012).

The contrast-enhanced ultrasonography used was SonoVue (Arm, Switzerland), 0.01 ml per assessed structure, administered by venous catheter in the cephalic vein, followed by the administration of five millilitres of saline (saline 0.9% saline).

After imaging techniques were carried out, the animals were submitted to orchietomy and testicular structures were collected to verify the normality of these tissues. The collected fragments were fixed in 10% formalin solution, (phosphate buffered, pH 7.4) and routinely processed to paraffin embedding. Five-micrometre sections were made in microtome and then stained with haematoxylin and eosin. In the analysis of light microscopy, histological features of biopsied tissues were observed.

R Software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) was used for the statistical analysis. Results were initially analysed for normality (Shapiro test). Raw or transformed data were evaluated using t-test to compare the right and left values, once comproved equality, the general average, confidence interval and descriptive statistical were calculated. Pearson correlation and linear regression

analyses between the quantitative values of Doppler and contrast-enhanced ultrasonography were carried out. The significance level used was of 5% and fixed for all tests.

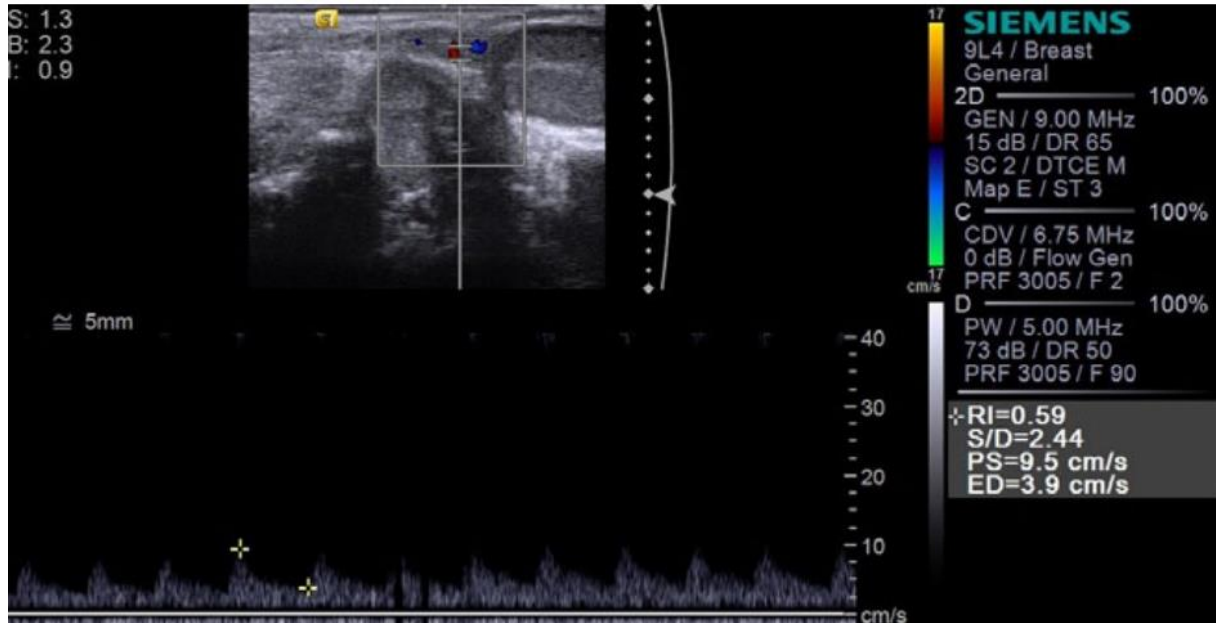
## **Results**

At clinical examination, the animals were healthy, and specific examinations of the testicles of all animals studied showed a firm consistency, with thin scrotal skin and without abrasions. In addition, the macro- and microscopic histologic parameters of testicles after castration were normal.

The B-mode ultrasound showed that the testicular echotexture and echogenicity of the studied animals were homogeneous and normal (hypo-echoic in relation to adjacent tissue), with clear visualization of the mediastinum testis as a thin hyperechoic central line in the longitudinal plane and as a hyperechoic central point when viewed in the transverse plane.

The Doppler and contrast-enhanced ultrasonography were reliably performed in all felines, yielding images of good quality. No adverse effects were noted in any animal during the procedures.

On colour Doppler, the testicular artery was observed in the spermatic cord and exhibited a tortuous pattern. Spectral Doppler of the testicular artery showed monophasic-patterned waves and low vascular resistance and with systolic peak evident (Fig. 1). The values for the indices vascular of right and left testicular artery in felines are shown in Table 1.



**Fig. 1.** Colour and spectral Doppler ultrasound image in testicle of cat. Note the Doppler assessments to determine of vascular indices in testicular artery.

The testicular artery in its spermatic cord portion (of homogeneous form) was quickly filled by the contrast ultrasonography. Then, the contrast filled the subcapsular vascular structures, and after a few seconds, a homogeneous moderate enhancement of the parenchyma was observed, with parenchymal vessels still distinguishable. After the peak phase, a rapid homogeneous decrease in echogenicity was detected. After approximately 90 s, only few microbubbles were visible in the testicular parenchyma (Fig. 2). The values for the wash-in, peak enhancement and wash-out of right and left testicles in felines are shown in Table 1.

**Table 1.** Mean values and standard deviation for vascular indices of the testicular artery and wash-in, peak enhancement and wash-out of contrast-enhanced ultrasonography in testicular parenchyma of felines.

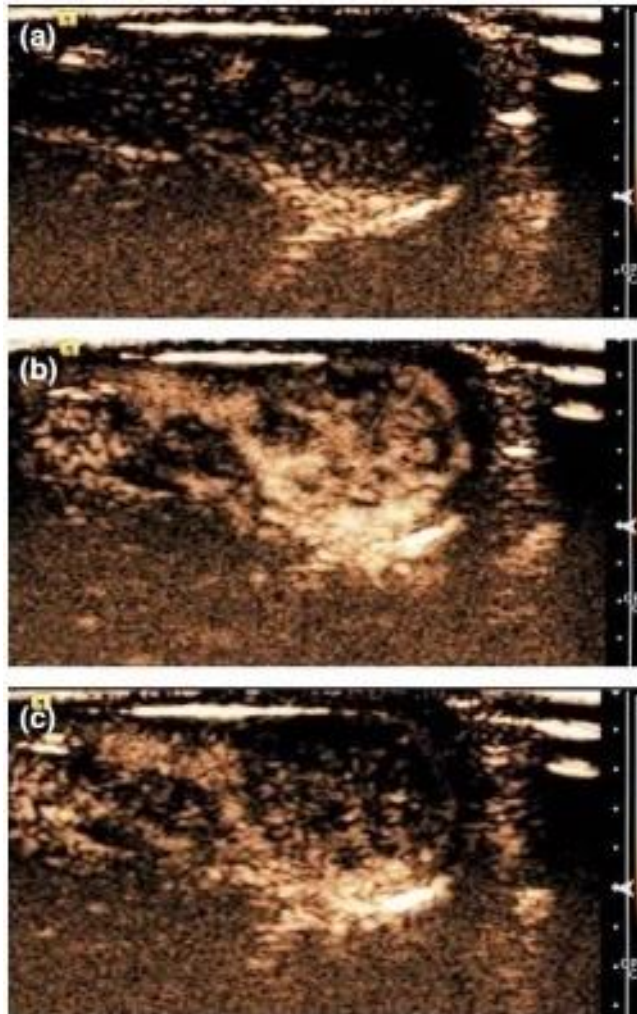
	Left testicle	CI 95%	Right testicle	CI 95%	P 5%
Doppler ultrasonography					
Systolic velocity (cm/s)	6.73 ± 2.78	5.89–7.58	6.23 ± 2.34	5.52–6.95	0.36
Diastolic velocity (cm/s)	2.80 ± 1.50	2.34–3.25	2.77 ± 1.36	2.35–3.18	0.92
Resistance index	0.54 ± 0.12	0.50–0.58	0.53 ± 0.12	0.49–0.57	0.67
Contrast-enhanced ultrasonography					
Wash-in (s)	8.78 ± 3.58	7.589–9.97	10.76 ± 4.04	9.41–12.11	0.038*
Peak enhancement (s)	21.62 ± 6.24	19.44–23.80	21.50 ± 5.81	19.47–23.53	0.76
Wash-out (s)	75.36 ± 20.20	68.53–82.20	81.81 ± 24.5	73.52–90.10	0.49

CI, confidence interval 95%; cm, centimetres; s, seconds.

\*5% of significance level.

By comparing the values of vascular indices and contrast ultrasound measurements of the right and left testicular structures, it was possible to verify that no statistical difference ( $P > 0.05$ ). To correlate these variables ( $P > 0.005$ ), except for wash-in, it was possible to check a faster time in the left testicle, compared to the right ( $P = 0.038$ ).





**Fig. 2.** Contrast-enhanced ultrasonography image of the testicle of cat in phases: (a) wash-in, (b) peak enhancement, and (c) wash-out

## **Discussion**

Testicular Doppler is a very important method for the study of vascular features, providing real-time information of the vascular and hemodynamic aspects of testicular artery architecture (Carvalho et al.,2008) of the reproductive organs of humans and animals, especially in helping detecting the conditions that may cause fertility problems (Silva et al.,2012). Contrast-enhanced ultrasonography improves the representation of parenchymal organ vascularization, intensifying the Doppler signal, allowing the detection and characterization of parenchymal lesions with greater sensitivity and specificity, aiding in the diagnosis of testicular diseases in humans (Valentino et al.,2011; Souza and Silva 2014). This is the first study describing the use of contrast ultrasound Doppler and in healthy testicular evaluating

feline, thus providing important reference values for the reproduction of veterinary obstetrics and cats.

Using the colour Doppler, the detection of feline testicular artery was consistent, identified dorsally, between testicular and epididymal structures and tortuous pattern, as described in the literature in canines (Nyland and Mattoon 2002; Carrillo et al.,2012; De Souza et al.,2014), stallions (Pozor and McDonnell 2004) and humans (Setchell and Breed 2006) unlike that observed in dogs (Carrillo et al.,2012; De Souza et al.,2014; Souza et al.,2014). The identification of marginal and intratesticular portions of the testicular artery in cats was limited, probably due to the small testicular volume, compared with the canines.

During the spectral Doppler exam, the testicular arteries of cats exhibited a pattern similar to that described in humans (Middleton et al.,1989) and in dogs (De Souza et al.,2014; Carrillo et al.,2012). According to Carvalho et al.,(2008), the testicular artery showed characteristics waves of low resistivity, with low pulsatility and resistance, featuring flows with large and continuous systolic peaks and high-speed flow during diastole, typical of organs with continuous demand for blood.

Regarding the vascular indices of the testicular artery in cats, the values for systolic and diastolic velocities are lower than those observed in canines (SV: 21.06 1.3 cm/s and DV: 4.85 0.44 cm/s, Carrillo et al.,2012; De Souza et al.,2014; Souza et al.,2014), justified by its smaller testicular structures, which requires less blood supply than the canine testicular tissue. But the RI of assessed vessels is similar to canines (Carrillo et al.,2012; De Souza et al.,2014; Souza et al.,2014), as this feature depends on other factors such as vessel diameter and blood flow region, with no influence of the tissue evaluated size.

According to Schurich et al.,(2009), contrast ultrasound is a recent technique that allows the evaluation of macro- and microvascular tissue in animals and humans, providing relevant information on testicular perfusion. The first study of the technique in testicular evaluation of small animals was reported by Volta et al.,(2014) in dogs, so the present study brings the novelty of the application of contrast ultrasound in the study of testicular perfusion in cats.

As in canines (Volta et al.,2014), contrast ultrasound technique was performed reliably and safely, producing images of good quality and observing fast testicular

tissue filling by the contrast. According to Volta et al.,(2014), the contrast flow is fast in the testes due to the testicular artery being a direct branch of the abdominal aorta.

In the present study, it was observed that the left testicular structures had less contrast entry time than the right testicles of felines. In dogs, that feature also occurs and is explained by the difference of the observed testicular volume (left testicle greater volume), requiring a greater blood flow to this structure. In this context, even if it was not statistically different in the speed of blood flow to the right testicular structure and left in cats, you can see a trend of a greater flow to the left testicle of these animals (see Table 1).

It is important to comment some considerations and limitations observed in this study:

1. Acquisition of the measurements: the Doppler and contrast-enhanced ultrasonography of the testes in felines were performed with no difficulty; the disposition of the animals allowed us to perform the examinations without the need for sedation; and due to location of the evaluated structures, there was no interference from movements (e.g. respiratory) that hindered the acquisition of the measurements.
2. Age variation: age variation suggests that further studies must be conducted including testicular evaluation of animals of different age groups. However, this study provides important information about the validation of the technique and about obtaining reference values for adult male cats.
3. Animals with testicular disorders: it is necessary to assess the applicability of these imaging techniques in the diagnosis of testicular diseases of cats. Both Doppler and ultrasound contrast technique may be used to detect the abnormalities in testicular canine testis (Domingos and Salom~ao 2011; Volta et al.,2014).

## **Conclusion**

Doppler and contrast-enhanced ultrasonography of the testicles in healthy adult cats were easily implemented and may provide baseline data for this organ to allow the use of these techniques as a diagnostic tool for evaluating testicular abnormalities in sick cats.

## **Acknowledgements**

The authors would like to thank FAPESP for the financial support to the research group and support scholarships (processes 2012/16635-2 and 2013/06443-1).

## **Conflict of interest**

None of the authors have any conflict of interest to declare.

## **Author contribution**

Brito MBS and Feliciano MAR designed the research; participated in acquisition, analysis and interpretation of data; and drafted and critically revised the manuscript. Coutinho LN, Uscategui, RR, Simoes APR, Maronezi MC Almeida VT, Crivelaro RM, Gasser B ~ and Pavan L participated in acquisition, analysis or interpretation of data. Vicente WRR also involved in designing the research and drafting and critical revision of the manuscript

## **References**

- Brandão CVS, Manprim M, Ranzani JJT, Marinho LFLP, Borges AG, Zanini M, Antunes SHS, Bicudo ALC, 2006: Orquiectomia para redução do volume prostático. Estudo experimental em cães. Arch Vet Sci 11, 7–9.
- Carrillo JD, Soler M, Lucas X, Agut A, 2012: Colour and pulsed doppler ultrasonographic study of the canine testis. Reprod Dom Anim 47, 655–659.
- Carvalho CF, Chammas MC, Cerri GG, 2008: Principios físicos do Doppler em ultrassonografia. Ciência Rural 38, 872–879.
- Davidson AP, Tomas WB, 2009: Reproductive ultrasound of the dog and tom. Top Companion Anim Med 24, 64–70.
- De Souza MB, Barbosa CC, Pereira BS, Monteiro CLB, Pinto JN, Linhares JCS, Da Silva LDM, 2014: Doppler velocimetric parameters of the testicular artery in healthy dogs. Res Vet Sci 96, 533–536.
- Domingos TCS, Salom~ao MC, 2011: Diagnostics tools of testicular disorders in dogs: review. Rev Bras Reprod Anim 35, 393–399.
- Feldman EC, Nelson RW, 1987: Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. W.B. Saunders, Philadelphia, 785 pp.

King AM, 2006: Development, advances and applications of diagnostic ultrasound in animals. *Vet J* 171, 408–420.

Middleton WD, Thorne DA, Melson GL, 1989: Color Doppler ultrasound of the normal testis. *Am J Radiol* 152, 293–297.

Nyland TG, Mattoon JS, 2002: *Veterinary Diagnostic Ultrasound*. W.B. Saunders, Philadelphia, 461 pp.

Pinggera GM, Mitterberger M, Bartsch G, Strasser H, Gradl J, Aigner F, Pallwein L, Frauscher F, 2008: Assessment of the intratesticular resistive index by colour Doppler ultrasonography measurements as a predictor of spermatogenesis. *BJU Int* 101, 722–726.

Pozor MA, McDonnell SM, 2004: Color Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions. *Theriogenology* 61, 799–810.

Schurich M, Aigner F, Frauscher F, Pallwein L, 2009: The role of ultrasound in assessment of male fertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 144, S192–S198.

Setchell BP, Breed WG, 2006: Anatomy, vasculature and innervations of the male reproduction tract. In: Neill JD (ed.), *Knobil's and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, New York, pp. 771–825.

Silva LDM, De Souza MB, Barbosa CC, Pereira BS, Monteiro CLB, Freitas LA, 2012: Bi-dimensional-ultrasonography and Doppler to evaluate the reproductive tract of small animals. *Ciência Anim* 22, 339–353.

Souza MB, Silva LDM, 2014: Two-dimensional, Doppler and contrast enhanced ultrasonography on testicular evaluation: from man to animal. *Rev Bras Reprod Anim* 38, 86–91.

Souza MB, Mota Filho AC, Sousa CVS, Monteiro CLB, Carvalho GG, Pinto JN, Linhares JCS, Silva LDM, 2014: Triplex Doppler evaluation of the testes in dogs of different sizes. *Pesq Vet Bras* 34, 1135–1140.

Takeda CSI, Carvalho CF, Chammas MC, 2012: Ultrassonografia contrastada na medicina veterinária – revisão. *Clin Vet* 17, 108–114.

Valentino M, Bertolotto M, Derchi L, Bertaccini A, Pavlica P, Martorana G, Barozzi L, 2011: Role of contrast enhanced ultrasound in acute scrotal disease. *Eur Radiol* 21, 1831–1840.

Volta A, Manfredi S, Vignoli M, Russo M, England GCW, Rossi F, Bigliardi E, Di Ianni F, Parmigiani E, Bresciani C, Gnudi G, 2014: Use of contrast-enhanced ultrasonography in chronic pathologic canine testes. *Reprod Dom Anim* 49, 202–209.

Zelli R, Troisi A, Elad Ngonput A, Cardinali L, Polisca A, 2013: Evaluation of testicular artery blood flow by Doppler ultrasonography as a predictor of spermatogenesis in the dog. *Res Vet Sci* 95, 632–637.