

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
Tese será disponibilizado somente
a partir de 27/02/2027

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

**ULTRASSONOGRAFIA MODO-B, DOPPLER, ELASTOGRAFIA ARFI
E CONTRASTADA POR MICROBOLHAS (CEUS) DO SISTEMA
REPRODUTOR DE CÃES E A CORRELAÇÃO COM A QUALIDADE
ESPERMÁTICA**

Luiz Paulo Nogueira Aires

Médico Veterinário

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

**ULTRASSONOGRAFIA MODO-B, DOPPLER, ELASTOGRAFIA ARFI
E CONTRASTADA POR MICROBOLHAS (CEUS) DO SISTEMA
REPRODUTOR DE CÃES E A CORRELAÇÃO COM A QUALIDADE
ESPERMÁTICA**

Discente: Luiz Paulo Nogueira Aires

Orientador: Prof. Dr. Marcus Antônio Rossi Feliciano

Coorientadora: Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em Ciências
Veterinárias (Saúde Animal).**

A298u

Aires, Luiz Paulo Nogueira

Ultrassonografia modo-b, doppler, elastografia arfi e contrastada por microbolhas (ceus) do sistema reprodutor de cães e a correlação com a qualidade espermática / Luiz Paulo Nogueira Aires. -- Jaboticabal, 2026

141 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Marcus Antônio Rossi Feliciano

Coorientadora: Lindsay Unno Gimenes

1. Ultrassonografia veterinária. 2. Andrologia veterinária. 3. Testículos. 4. Próstata. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ULTRASSONOGRAFIA MODO-B, DOPPLER, ELASTOGRAFIA ARFI E CONTRASTADA POR MICROBOLHAS (CEUS) DO SISTEMA REPRODUTOR DE CÃES E A CORRELAÇÃO COM A QUALIDADE ESPERMÁTICA

AUTOR: LUIZ PAULO NOGUEIRA AIRES

ORIENTADOR: MARCUS ANTÔNIO ROSSI FELICIANO

COORIENTADOR: COORIENTADORA: LINDSAY UNNO GIMENES

ORIENTADOR DE MOBILIDADE: MARCO RUSSO (Internacional)

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências Veterinárias, área: Saúde Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCUS ANTÔNIO ROSSI FELICIANO (Participação Presencial)
Departamento de Medicina Veterinária / FZEA USP Pirassununga/SP



Documento assinado digitalmente
MARCUS ANTONIO ROSSI FELICIANO
Data: 04/03/2026 15:23:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. PEDRO PAULO MAIA TEIXEIRA (Participação Virtual)
Instituto de Medicina Veterinária (UFPA) / Castanhal/PA



Documento assinado digitalmente
PEDRO PAULO MAIA TEIXEIRA
Data: 03/03/2026 10:52:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. DANUTA PULZ DOICHE (Participação Presencial)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal



Documento assinado digitalmente
DANUTA PULZ DOICHE
Data: 03/03/2026 14:01:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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



Documento assinado digitalmente
FELIPE FARIAS PEREIRA DA CAMARA BARROS
Data: 03/03/2026 11:31:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. MARICY APPARÍCIO FERREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal / FMV



Documento assinado digitalmente
MARICY APPARICIO FERREIRA
Data: 03/03/2026 14:39:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 27 de fevereiro de 2026.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Luiz Paulo Nogueira Aires – nascido em São José do Rio Preto (SP), Brasil, em 09 de maio de 1995. Graduado em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário de Rio Preto/UNIRP, São José do Rio Preto (2013 – 2017). Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação Científica pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), desenvolvendo projeto em parceria com o Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP) e a Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Realizou treinamento prático (*trainee*) em Diagnóstico por Imagem pela empresa privada Digital Vet – Radiodiagnóstico Veterinário, São José do Rio Preto (2018 – 2019). Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/UNESP, Câmpus de Jaboticabal (Bolsista CNPq durante o período do Mestrado). Atualmente é Doutorando em Ciências Veterinárias (Saúde Animal) pela mesma Instituição e bolsista FAPESP. Realizou um período de Bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior (BEPE) pela FAPESP, na Università degli Studi di Napoli “Federico II”, sob supervisão do Prof. Marco Russo DVM, PhD, CrECVDI, MRCVS, onde realizou também um *Externship* na qualidade de *Visiting PhD* nos setores de Reprodução Veterinária (Clínica Reprodutiva de Pequenos Animais, Imagem Reprodutiva de Animais Domésticos) e Radiologia Veterinária (Radiologia Geral, Ultrassonografia e Tomografia Computadorizada). Possui experiência nas áreas de Diagnóstico por Imagem e Clínica Reprodutiva, com linha de pesquisa em Imagem Reprodutiva e Técnicas Avançadas em Ultrassonografia Veterinária.

EPÍGRAFE

“O que observamos não é a natureza em si, mas a natureza exposta ao nosso método de questionamento.”

— Werner Heisenberg

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que acreditam na ciência como processo, mesmo quando o rigor exige mais perguntas do que respostas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Rildo e Lúcia, que sempre estiveram ao meu lado e me forneceram apoio incondicional durante toda essa trajetória. Vocês são meus alicerces, a base de tudo o que sou e estão por trás de tudo o que já conquistei na vida. Meu amor por vocês é imenso.

Agradeço à minha irmã, Cristiane, que sempre foi meu exemplo de dedicação, esforço, vontade de aprender e também dedicação ao ensino. Você foi minha primeira professora, me ensinou como aprender, como estudar e como também ensinar. Minhas sobrinhas, Heloisa e Gabriela, que trazem toda a dose de fofura e amor que eu precisava ao longo desse percurso para poder recarregar minhas energias.

Agradeço às instituições de ensino, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP Jaboticabal), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP Pirassununga), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/USP São Paulo) e Università degli Studi di Napoli “Federico II” (UNINA) pelas quais passei durante esse percurso e contribuíram com todo esse trabalho. É uma honra imensurável dizer que durante meu percurso do Doutorado, passei de alguma maneira por cada uma dessas instituições e que cada uma delas contribuiu tanto para a minha formação quanto para o desenvolvimento do meu Projeto de Pesquisa.

Agradeço ao meu orientador, Professor Marcus Antônio Rossi Feliciano, que viu em mim potencial e me moldou como profissional e pesquisador. Agradeço todas as oportunidades que o senhor me forneceu durante todo esse tempo.

Agradeço à minha coorientadora, Professora Lindsay Unno Gimenes, que me forneceu apoio, que teve paciência e pegou na minha mão para me ensinar etapas fundamentais para a realização do projeto.

Agradeço ao Professor Marco Russo, meu supervisor durante meu período de Doutorado Sanduíche. O senhor foi um dos profissionais mais incríveis com quem tive o prazer de trabalhar e jamais poderei expressar o quanto sou grato por tudo o que já fez por mim. Nunca alguém acreditou tanto em mim quanto o senhor e me deu tantas oportunidades quanto o senhor me deu. Serei eternamente grato.

Agradeço ao Professor André Furugen Cesar de Andrade do Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES) da FMVZ/USP e seus orientados, Henricco, Isadora e Luan, pela parceria e disponibilidade. O apoio de

vocês foi fundamental para uma etapa tão importante da minha pesquisa com as análises do CASA e Citometria de Fluxo. Sem a parceria de vocês, nada disso teria sido possível.

Ao Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof Dr. Flavio Prada” e todos os seus integrantes, em especial, Stephanie, Elaine e Kelly, que também foram fundamentais para que a primeira etapa desse estudo fosse realizada.

Ao Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária (CEPTOX) da FMVZ/USP e em especial às técnicas Ester e Elaine, que foram extremamente prestativas durante a realização do experimento e estiveram sempre dispostas a ajudar com tudo, o que permitiu que tudo fluísse da maneira mais tranquila possível.

Agradeço aos meus amigos de Pós-graduação da FCAV/UNESP. Tive o prazer de conviver com tantas pessoas incríveis, que fizeram toda a diferença na minha trajetória. Em especial Priscila, Beatriz e Joedson, que foram essenciais para a minha primeira etapa de experimento do Doutorado. Foi um prazer trabalhar com vocês e sou muito grato em tê-los como amigos. Sei que posso contar com cada um de vocês, assim como vocês também podem contar comigo.

Agradeço aos amigos da FZEA/USP, em especial aos colegas do Laboratório de Imaginologia Veterinária (LIV/FZEA-USP). Convivi com tantas pessoas que passaram ali, em especial Stefany, Denise, Tamiris, Diana, Diego, Felipe, Camila, Anna, Ana Letícia, Gabriela, Desirée, Vitória, Gabriel, Stefani, Fredd, Giovanna e Clara. E agradeço também à Sâmara, que foi por muito tempo uma “agregada” do LIV. Dividimos muitos momentos de trabalho intenso, de diversão, de comilança, de estresse, correria e tudo valeu a pena. Vocês foram fundamentais para a minha segunda etapa de experimento do Doutorado e sou muito grato.

Agradeço a todas as pessoas maravilhosas que tive o prazer de conhecer durante meu período em Nápoles. Em especial, Daniela, que me “adotou” e me fez viver momentos incríveis durante todo o ano. Dani, você se tornou uma das minhas melhores amigas do mundo todo e sou uma pessoa melhor por ter te conhecido. Tenho um espaço enorme no meu coração para a nossa amizade e sei que nosso laço é pra sempre. Ti voglio bene e spero vederti presto presto!!

Agradeço ao meu caro amigo Stefano Spada, um mini gênio, que foi fundamental durante meu período inicial de adaptação e que tenho orgulho de dizer que te conheço e sou seu amigo. Agradeço também aos demais amigos da Università degli Studi di Napoli “Federico II” (UNINA), Erica, Beatrice, Riccardo, Stefano, Alfonso, Pierpaolo, Giulia, Camila, Dario, Chiara e Francesca. E não posso esquecer da Stefania, que sempre esbanjava simpatia e me arrancava risadas. Sou muito grato por ter conhecido e convivido com cada um de vocês.

Aos demais professores e pesquisadores da UNINA, Professor Leonardo Meomartino, Professora Adelaide Greco, Professora Bianca Gasparrini, Professora Natascia Cocchia e Chiara Del Prete. Vocês sempre se preocupavam em me fazer me sentir em casa, em me dar oportunidades, me ensinar o que podiam e minha estadia foi muito leve por conta de vocês. Dizer que tive a oportunidade de conviver e aprender com cada um de vocês é uma honra sem tamanho.

Agradeço aos amigos Francesco, Irene, Sotiris, Arthur e Marisya da “Brigata Bologna Gang”, com quem tive o prazer de conviver durante um ano incrível. Das nossas conversas mais fúteis até as mais profundas, dos dias de chocolate quente, de cerveja, de pizza, de Flannery’s e de Aperitivo, sou extremamente feliz em ter conhecido vocês.

Agradeço aos amigos da República Antro do HV, que foram tão importantes para mim durante meu período morando em Jaboticabal, desde o início do Mestrado. Aos amigos da República Los Primos, que me fizeram me sentir em casa em Pirassununga.

Agradeço à minha psicóloga, Camila Borges, que me permitiu trilhar essa jornada tão complexa e desafiadora de uma maneira consciente, equilibrada e com clareza. Que me ensinou a reconhecer meus méritos, minhas dificuldades e também me ensinou a ter empatia comigo mesmo quando necessário, sem ser demasiadamente permissivo. Seu acompanhamento, repleto de sensibilidade e profissionalismo ao longo dessa trajetória teve um grande papel no desempenho positivo que obtive.

Agradeço aos membros da comissão avaliadora, Prof. Dr. Pedro Paulo Maia Teixeira, Profa. Dra. Danuta Pulz Doiche, Prof. Dr. Felipe Farias Pereira da Câmara

Barros e Profa. Dra. Mariciy Apparício Ferreira pela disponibilidade, importantes correções, direcionamentos e sugestões.

Agradeço ao Jair Matos e a Siemens Healthineers pela assistência técnica prestada na etapa inicial do trabalho.

Agradeço ao Alysso Agostini, Regis Werlang e Andres Enriquez da RTS/Esote Healthcare do Brasil pela assistência técnica prestada ao longo da segunda etapa do trabalho.

Este trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. A pesquisa também contou com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processos nº 22/04907-0 e nº 23/13094-5).

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xvii
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	1
1 Introdução.....	1
2 Revisão de Literatura.....	2
2.1 O Potencial Reprodutivo do Macho Canino	2
2.2 Avaliação Seminal.....	2
2.3 Ultrassonografia.....	7
2.3.1 Modo-B	7
2.3.1.1 Ultrassonografia Modo-B dos Testículos e Próstata do Cão.....	7
2.3.2 Doppler	8
2.3.2.1 Ultrassonografia Doppler dos Testículos e Próstata do Cão.....	10
2.3.3 Elastografia	12
2.3.3.1 Métodos Quasi-static	12
2.3.3.2 Métodos Dinâmicos	14
2.3.3.3 Elastografia do Sistema Reprodutivo de Cães	15
2.3.4 Ultrassonografia Contrastada por Microbolhas (CEUS).....	17
2.3.4.1 CEUS no Sistema Reprodutor do Macho Canino	20
2.3.5 Ultrassonografia Multiparamétrica	21
3 OBJETIVOS.....	22
REFERÊNCIAS.....	22

Capítulo 2 – Multiparametric Ultrasound (MPUS) of the Testes of Normozoospermic Dogs – A Pilot Study¹	30
1 Introduction	31
2 Results	33
2.1 Ultrasonographic findings	33
2.1.1 B-mode	33
2.1.2 Doppler	34
2.1.3 Two-dimensional shear wave elastography (2D-SWE).....	37
2.1.4 Contrast-enhanced Ultrasound (CEUS).....	39
2.2 Seminal assessment	40
3 Discussion	41
4 Methods	50
4.1 Animals	50
4.2 Ultrasonographic Evaluation	51
4.2.1 Doppler Ultrasonography	52
4.2.2 Two-dimensional shear wave elastography (2D-SWE).....	53
4.2.3 Contrast-enhanced Ultrasound (CEUS).....	54
4.3 Semen Evaluation	54
4.3.1 Standardization of semen collection period and sexual rest	54
4.3.2 Subjective assessment of motility and velocity	55
4.3.3 Evaluation of sperm concentration, morphology and plasmatic membrane integrity	55
4.3.4 Concentration of alkaline phosphatase in seminal plasma (sALP)	56
4.3.5 Criteria for normozoospermia.....	56
4.4 Statistical analysis	57
References	58

CAPÍTULO 3 – Multiparametric Ultrasound of the Canine Prostate: A Pilot Study¹	64
.....	
1 INTRODUCTION	66
2 Material and Methods	68
2.1 Animals	68
2.2 Ultrasonographic evaluation	69
2.2.1 B-mode evaluation	69
2.2.2 Doppler evaluation	70
2.2.3 Two-dimensional Shear-wave Elastography (2D-SWE).....	71
2.2.4 CEUS Evaluation	71
2.3 Seminal evaluation	72
2.4 Statistical Analysis	73
3 RESULTS	74
3.1 Ultrasonographic Findings	74
3.2 Seminal Evaluation	81
4 DISCUSSION	82
5 CONCLUSION	89
REFERENCES	90
CAPÍTULO 4 – Exploratory Associations Between Quantitative Multiparametric Testicular Ultrasound and Semen Quality in Dogs¹	97
.....	
1 INTRODUCTION	99
2 MATERIAL AND METHODS	100
2.1 Animals	101
2.2 Ultrasound Evaluation	101
2.2.1 B-mode Ultrasound	102
2.2.2 Doppler Ultrasound	102

2.2.3	Two-dimensional Shear-wave Elastography (2D-SWE).....	103
2.2.4	Contrast-enhanced Ultrasound (CEUS).....	105
2.3	Semen Collection and Sperm Concentration	108
2.4	Computerized Analysis of Sperm Motility and Kinetics	108
2.5	Evaluation of Plasma and Acrosomal Membrane Integrity by Flow Cytometry.....	109
2.6	Statistical Analysis	112
3	RESULTS	113
3.1	B-mode Findings.....	114
3.2	Doppler Findings.....	114
3.3	2D-SWE Findings	115
3.4	CEUS Findings	117
3.5	Semen Analysis Findings.....	119
3.6	Exploratory Correlations	120
3.6.1	Correlations Between Ultrasonographic Techniques	120
3.6.2	Correlations Between Ultrasonographic Techniques and Semen Parameters.....	121
3.7	Principal Components Analysis (PCA)	122
4	DISCUSSION.....	124
5	CONCLUSION	131
	REFERENCES.....	133

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Ultrassonografia modo-B, Doppler, Elastografia ARFI e Contrastada por Microbolhas (CEUS) do Sistema Reprodutor de Cães e a correlação com a qualidade espermática"**, protocolo nº 1642/21, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcus Antônio Rossi Feliciano, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 19 de agosto de 2021.

Vigência do Projeto	01/08/2021 a 01/12/2024
Espécie / Linhagem	Canina
Nº de animais	30 animais
Peso / Idade	Até 40kg/ 2 a 6 anos
Sexo	Machos
Origem	<ul style="list-style-type: none"> - Setor de Obstetria Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP/Jaboticabal, Brasil - Laboratório de Pesquisas em Nutrição e Doenças Nutricionais de cães e gatos "Prof. Dr Flávio Prada" da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP/Jaboticabal - Canis criadores de Jaboticabal e região.

Jaboticabal, 19 de agosto de 2021.


Profa. Dra. Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

ULTRASSONOGRAFIA MODO-B, DOPPLER, ELASTOGRAFIA ARFI E CONTRASTADA POR MICROBOLHAS (CEUS) DO SISTEMA REPRODUTOR DE CÃES E A CORRELAÇÃO COM A QUALIDADE ESPERMÁTICA

RESUMO – A qualidade seminal é considerada um importante indicador do potencial reprodutivo do macho canino, refletindo a integridade anatômica, vascular e funcional do sistema reprodutor. Embora a ultrassonografia seja amplamente utilizada como exame complementar na avaliação andrológica, a abordagem ultrassonográfica convencional apresenta limitações quanto à predição do potencial reprodutivo do cão. Ademais, a aplicação integrada de técnicas ultrassonográficas avançadas permanece pouco explorada na andrologia humana e veterinária. Dessa forma, esta tese teve como objetivo investigar a aplicação da ultrassonografia multiparamétrica no sistema reprodutor do macho canino por meio da condução de três estudos complementares: (1) padronização da abordagem multiparamétrica (modo B, Doppler, elastografia e ultrassonografia contrastada por microbolhas) na avaliação testicular de cães normozoospermicos; (2) padronização da abordagem multiparamétrica na avaliação prostática de cães normozoospermicos; e (3) estudo exploratório das associações entre parâmetros quantitativos da ultrassonografia multiparamétrica testicular e parâmetros seminais avançados em uma população canina heterogênea. A análise seminal foi realizada em duas etapas, compreendendo inicialmente uma abordagem de rotina e, posteriormente, investigações avançadas por meio de análise computadorizada da motilidade espermática (CASA) e citometria de fluxo. A avaliação testicular permitiu a caracterização anatômica, hemodinâmica, elástica e perfusional dos testículos, enquanto a avaliação prostática explorou a factibilidade técnica da abordagem multiparamétrica aplicada à glândula. De forma geral, a padronização da ultrassonografia multiparamétrica foi alcançada; entretanto, especialmente na avaliação prostática, limitações técnicas relevantes foram identificadas, reforçando a necessidade de padronização entre diferentes plataformas ultrassonográficas. Quanto às associações entre parâmetros sonográficos e seminais, os resultados demonstraram que variáveis relacionadas à rigidez tecidual e à perfusão apresentaram associações relevantes com aspectos funcionais do sistema reprodutor, incluindo a qualidade seminal, enquanto parâmetros obtidos

exclusivamente pelo modo B e Doppler apresentaram desempenho limitado ou inconsistente. Conclui-se que a ultrassonografia multiparamétrica constitui uma ferramenta promissora como método complementar na avaliação do sistema reprodutor masculino de cães, com potencial aplicação em contextos clínicos e científicos, contribuindo para o aprimoramento da investigação andrológica e da compreensão da aptidão reprodutiva do macho canino.

Palavras-chave: Andrologia; Canino; Técnicas de Imagens por Elasticidade; Ultrassonografia Doppler; Ultrassonografia Contrastada por Microbolhas; Ultrassonografia Multiparamétrica

B-MODE ULTRASONOGRAPHY, DOPPLER, ELASTOGRAPHY AND CONTRAST ENHANCED ULTRASOUND (CEUS) OF THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF DOGS AND CORRELATION TO SEMINAL QUALITY

ABSTRACT – Semen quality is considered an important indicator of reproductive potential in the male dog, reflecting the anatomical, vascular, and functional integrity of the reproductive system. Although ultrasonography is widely used as a complementary tool in andrological evaluation, conventional ultrasonographic approaches present limitations regarding the prediction of reproductive potential in dogs. Furthermore, the integrated application of advanced ultrasonographic techniques remains poorly explored in both human and veterinary andrology. Therefore, the aim of this thesis was to investigate the application of multiparametric ultrasound to the male canine reproductive system through the conduction of three complementary studies: (1) standardization of a multiparametric approach (B-mode, Doppler, elastography, and contrast-enhanced ultrasound) for testicular evaluation in normozoospermic dogs; (2) standardization of the multiparametric approach for prostatic evaluation in normozoospermic dogs; and (3) an exploratory investigation of associations between quantitative testicular multiparametric ultrasound parameters and advanced semen parameters in a heterogeneous canine population. Semen analysis was performed in two stages, initially comprising a routine evaluation and subsequently advanced investigations using computer-assisted sperm analysis (CASA) and flow cytometry. The testicular assessment allowed anatomical, hemodynamic, elastic, and perfusional characterization of the testes, whereas the prostatic evaluation explored the technical feasibility of applying the multiparametric approach to the prostate gland. Overall, multiparametric ultrasound standardization was achieved; however, particularly in prostatic evaluation, relevant technical limitations were identified, reinforcing the need for protocol standardization across different ultrasound platforms. Regarding the relationships between sonographic and seminal parameters, the results demonstrated that variables related to tissue stiffness and perfusion showed relevant associations

with functional aspects of the reproductive system, including semen quality, whereas parameters obtained exclusively from B-mode and Doppler ultrasound exhibited limited or inconsistent performance. In conclusion, multiparametric ultrasound represents a promising complementary tool for the evaluation of the male canine reproductive system, with potential applications in both clinical and research settings, contributing to the advancement of andrological investigation and to a better understanding of male reproductive soundness.

Keywords: Andrology; Canine; Elasticity imaging techniques; Doppler ultrasonography; Contrast-enhanced ultrasound; Multiparametric ultrasound

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	microliter (microlitro)
μm	micrometer (micrômetro)
$\mu\text{m/s}$	micrometers per second (micrômetros por segundo)
$\mu\text{m}^2/\text{s}$	micrometers squared per second (micrômetros quadrados por segundo)
1D-TE	One-dimensional transient elastography (Elastografia transitória unidimensional)
2D-SWE	Two-dimensional shear wave elastography (Elastografia bidimensional por onda de cisalhamento)
ALH	Amplitude of lateral head displacement (amplitude do deslocamento lateral da cabeça)
ANOVA	Analysis of variance (análise de variância)
ARFI	Acoustic radiation force impulse
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
AUC	Area under the curve (Área sob a curva)
BCF	Beat cross frequency (Frequência de cruzamento do batimento)
B-mode (Modo-B)	Brightness mode (Modo brilho)
BSE	Breeding soundness evaluation
CASA	Computer-assisted sperm analysis
CD	Color Doppler
CDFA	Carboxyfluorescein diacetate (Diacetato de carboxifluoresceína)
CEUS	Contrast-enhanced ultrasound (Ultrassonografia contrastada)
CI	Confidence interval (intervalo de confiança)

cm	Centimeters (Centímetros)
CnTI™	Contrast-tuned imaging
CONSORT	Consolidated Standards of Reporting Trials
CPS	Contrast pulse sequencing
DCE-US	Dynamic contrast-enhanced ultrasound
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
DSR	Distal suprastesticular region
DWI	Diffusion-weighted imaging (Imagem por difusão)
EDV	End-diastolic velocity
EFSUMB	European Federation of Societies in Ultrasound in Medicine and Biology
ETR	Epididymal testicular region
FITC-PSA	Fluorescein isothiocyanate– <i>Pisum sativum</i> agglutinin (Aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada a isotiocianato de fluoresceína)
FLAIR	Fluid attenuated inversion recovery
FTR	Free testicular region
G	Gauge
HOST	Hypo-osmotic swelling test (Teste hiposmótico)
Hz	Hertz
Intra.	Intratesticular region
IP (PI, Doppler)	Índice de pulsatilidade (Pulsatility index)
IPDA	Intact plasma membrane, damaged acrosome
IPIA	Intact plasma membrane, intact acrosome
IR (RI)	Índice de resistividade (Resistance index)

ISUOG	International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology
IU	International units
KCl	Potassium chloride
kg	Kilogram (Quilograma)
KMO	Kaiser–Meyer–Olkin
LIN	Linearity (Linearidade)
m/s	meters per second (metros por segundo)
Marg.	Marginal region
MgCl₂·6H₂O	Magnesium chloride hexahydrate
MHz	Megahertz
MI	Mechanical index
MIS	Membrane intact sperm cells
mL	milliliter (mililitro)
mm	millimeter (milímetro)
mM	millimolar
MNS	Morphologically normal sperm cells
mpMRI	Multiparametric magnetic resonance imaging (Ressonância magnética multiparamétrica)
mpUS (MPUS)	Multiparametric ultrasound (Ultrassonografia multiparamétrica)
MRI (RM)	Magnetic resonance imaging (Ressonância magnética)
MSR	Middle suprastesticular region
MTR	Mediastinal testicular region
MTT	Mean transit time (Tempo médio de trânsito)
NaCl	Sodium chloride

NaH₂PO₄·H₂O	Sodium dihydrogen phosphate monohydrate
°C	Degree Celsius (Grau Celsius)
PCA	Principal component analysis
PD	Proton density
PI (CEUS)	Peak intensity
PI (Citometria)	Propidium iodide (Iodeto de propídio)
Pixels	Average number of pixels
PML	Plasmatic membrane lesion
PMOT	Progressive motility
PSR	Proximal supratesticular region
PSV (VPS)	Peak systolic velocity (Velocidade de pico sistólico)
pSWE	Point shear wave elastography (Elastografia por Onda de Cisalhamento Pontual)
PWD	Pulsed-wave Doppler
RM-ANOVA	Repeated measures ANOVA
ROI	Region of interest
rpm	revolutions per minute
s	Seconds
sALP	Seminal alkaline phosphatase
SD	Standard deviation
SE	Strain elastography (Elastografia Strain)
sptz	Spermatozoa
sptz/mL	Spermatozoa per milliliter
STIR	Short tau inversion recovery

STR	Straightness
SWE	Shear-wave elastography (Elastografia por onda de cisalhamento)
SWI	Susceptibility-weighted imaging
SWV	Shear-wave velocity (Velocidade de cisalhamento)
T1	T1-weighted sequence (Sequência ponderada em T1)
T2	T2-weighted sequence (Sequência ponderada em T2)
TALPm	Modified Tyrode's albumin lactate pyruvate medium
TAMAX	Time-averaged maximum velocity
TAMN	Time-averaged mean velocity
TIC	Time-intensity curve (Curva de tempo-intensidade)
TMOT	Total motility
TSO	Total sperm output
TTP	Time to peak (Tempo para o pico)
UA	Unidade arbitrária
US	Ultrasound
VAP	Average path velocity (Velocidade média de trajetória)
VCL	Curvilinear velocity (Velocidade curvilínea)
VSL	Straight line velocity (Velocidade em linha reta)
WOB	Wobble
WOT	Wash-out time

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração do princípio de funcionamento do CASA.	4
Figura 2 - Fotomicrografias representativas da avaliação morfológica e da viabilidade espermática em cães por diferentes metodologias (aumento 1000x sob óleo de imersão).	6
Figura 3 - Imagens ultrassonográficas do testículo de um paciente canino em plano longitudinal (A) e transversal (B) . (Fonte: Arquivo Pessoal).	7
Figura 4 - Imagens ultrassonográficas representativas das principais amostragens de sinal Doppler na avaliação da artéria carótida comum de um cão.	9
Figura 5 - Representação do traçado Doppler espectral arterial em função do tempo (eixo horizontal) e velocidade (eixo vertical). O gráfico ilustra a variação da velocidade do fluxo sanguíneo ao longo do tempo, destacando as fases de sístole (área avermelhada) e diástole (área azulada). No ciclo cardíaco delimitado pelas linhas amarelas, observa-se o pico sistólico, correspondente à velocidade máxima durante a sístole, e o final da diástole. Estão também representadas a velocidade máxima ao longo do ciclo, indicada pelo tracejado branco, e a velocidade média ao longo do ciclo, indicada pelo tracejado azul. (Fonte: Arquivo Pessoal).	10
Figura 6 - Imagens ultrassonográficas representando o posicionamento do volume de amostra para a avaliação ao Doppler Pulsado das regiões da artéria testicular canina.	11
Figura 7 - Imagens ultrassonográficas representativas das técnicas elastográficas por deformação (Strain Imaging).	13
Figura 8 - Imagens ultrassonográficas representativas das técnicas elastográficas por onda de cisalhamento.	15
Figura 9 - Imagens ultrassonográficas contrastadas (CEUS) representativas das diferentes fases de perfusão renal. A. Imagem basal pré-contraste, obtida imediatamente após a administração intravenosa do meio de contraste, evidenciando o parênquima renal sem realce.	18
Figura 10 - Representação esquemática da análise quantitativa da ultrassonografia contrastada por meio da curva tempo–intensidade (TIC).	19

Figure 1. Waveform morphology variability of the proximal (A and B), middle (C and D) and distal (E and F) suprastesticular regions of the testicular artery obtained by Pulsed-wave Doppler.	35
Figure 2. 2-D SWE of the testis and epididymis of a dog.	38
Figure 3. Contrast-enhanced ultrasound (CEUS) of the right testis of a dog.....	39
Figure 1 - B-mode and Doppler ultrasound images of the canine prostate.....	75
Figure 2 - Elastographic evaluation of the canine prostate using the 2D-SWE technique.....	77
Figure 3 - Mean plot with 95% Confidence Interval (CI) of Prostatic SWV (m/s) and depth of evaluation (cm).....	78
Figure 4 - CEUS evaluation of the canine prostate and its enhancement pattern. ...	79
Figure 5 - CEUS quantification of prostatic perfusion of a dog..	81
Figure 1 - Representative 2D-SWE acquisitions illustrating the measurement protocol.	105
Figure 2 - Representation of the DCE-US methodology using the QPack software. Dual B-mode (left) and CEUS (right) images are shown in the upper panel, with three circular ROIs (blue, green, and orange) placed in representative areas of testicular enhancement. A rectangular box is seen around the testis, representing the selection of the area that the software applies the motion compensation algorithm. The lower panel shows a graph with the corresponding TICs, including the raw TICs from each	107
Figure 3 - Representative flow cytometry gating strategy and results for the evaluation of plasma and acrosomal membrane integrity in canine spermatozoa.....	111
Figure 4 - Contrast-enhanced Ultrasound (CEUS) evaluation of the canine testis, representing its enhancement pattern.....	118
Figure 5 - Principal Component Analysis (PCA) loading plot (PC1 × PC2) integrating ultrasonographic and semen variables. The plot illustrates the contribution and direction of each of the selected variable to the first two principal components, which together explain 63.9% of the total variance. (Abbreviations: IPIA: intact plasma membrane	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sumário dos principais parâmetros de perfusão estimados por meio da análise quantitativa da CEUS, com suas respectivas unidades de medida, explicações e interpretação geral.	20
Table 1. Mean \pm Standard deviation (SD) and confidence interval (CI) of the mean (95%) of the external measurement and ultrasonographic measurements of the right and left testes of normozoospermic dogs (n = 8).	34
Table 2. Mean \pm Standard Deviation (SD) and Confidence Interval (CI) of the mean (95%) of doppler velocimetric parameters of five distinct regions of the testicular artery of normozoospermic dogs (n = 8) obtained by Pulsed-wave ultrasound evaluation. .	36
Table 3. Mean \pm Standard Deviation (SD) and Confidence interval (CI) of the mean (95%) of the stiffness of the testes of normozoospermic dogs (n = 8) evaluated by shear-wave elastography (SWE).....	38
Table 4. Mean \pm Standard Deviation (SD) and Confidence interval (CI) of the mean (95%) of the stiffness of the epididymis of normozoospermic dogs (n = 8) evaluated by shear-wave elastography (SWE).....	38
Table 5. Mean \pm Standard deviation (SD) and confidence interval (CI) of the mean (95%) of the perfusion parameters of the testes of normozoospermic dogs (n = 8) evaluated by contrast-enhanced ultrasound (CEUS).	40
Table 6. Mean \pm Standard deviation (SD) and confidence interval (CI) of the mean (95%) of the seminal parameters evaluated of normozoospermic dogs (n = 8).	41
Table 1 - Mean \pm standard deviation (SD) and median [interquartile range] (IQR) of prostatic Doppler velocimetric parameters	76
Table 2 - Mean \pm Standard Deviation (SD) of Prostatic SWV (m/s) and Depth of evaluation (cm) according to the portions assessed.....	78
Table 3 - Mean \pm Standard Deviation (SD) of quantitative CEUS parameters of the canine prostate.....	81
Table 4 - Mean \pm Standard deviation (SD) of the seminal parameters evaluated of normozoospermic dogs.	82
Table 1 - Median and interquartile range [IQR] of the global testicular measurements obtained by B-mode evaluation (n = 21).....	114

Table 2 - Median and interquartile range [IQR] of the Doppler velocimetric parameters obtained from the canine testicular artery (n = 21).	115
Table 3 - Median and interquartile range [IQR] of shear-wave velocities (SWV) of the canine testes and epididymis obtained by Two-dimensional Shear wave Elastography (2D-SWE) (n = 21).....	116
Table 4 - Median and interquartile range [IQR] of the time-related perfusion parameters extracted from DCE-US assessment of the canine testes (n = 19).	119
Table 5 - Median and interquartile range [IQR] of the semen concentration and sperm kinetics (n = 21).	119
Table 6 - Median and interquartile range [IQR] of the sperm populations identified by flow cytometry analysis. (n = 21).	120

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1 Introdução

A avaliação de aptidão reprodutiva em cães é um procedimento comumente realizado com o intuito de atestar o potencial reprodutivo de cães com alto valor zootécnico e excluir animais inférteis da reprodução (Memon, 2007; Threlfall, 2003).

A ultrassonografia é considerada importante como exame complementar na investigação da capacidade reprodutiva do macho canino. Estudos prévios tentaram correlacionar achados ao modo-B dos testículos, como dimensões, volume, análise subjetiva e digital de ecogenicidade e ecotextura com a fertilidade canina (De Souza et al., 2015; England, 1991; England et al., 2017; Moxon et al., 2015), porém, o modo-B isoladamente tem valor limitado na avaliação reprodutiva do cão.

O Doppler é uma técnica ultrassonográfica que, associada ao modo-B, permite o estudo da arquitetura vascular e características hemodinâmicas dos vasos sanguíneos de diversos órgãos (Carvalho et al., 2008). Alguns estudos utilizaram o método na tentativa de correlacionar os resultados dopplervelocimétricos da artéria testicular, em suas diferentes porções, com a qualidade seminal do macho canino (De Souza et al., 2015; England et al., 2017; Trautwein et al., 2020; Zelli et al., 2013). Entretanto, resultados conflitantes e as diferenças metodológicas dessas investigações limitam o conhecimento da real aplicabilidade da técnica até o momento na avaliação de cães reprodutores, correlação com parâmetros de qualidade seminal e sua aplicação na rotina clínica.

Outras técnicas ultrassonográficas como a Elastografia e a ultrassonografia contrastada por microbolhas (CEUS) têm sido implementadas na medicina veterinária, demonstrando resultados promissores em diversas áreas, inclusive na reprodução animal e obstetrícia veterinária. Entretanto, a literatura é escassa quanto a estudos que apliquem essas técnicas de maneira complementar à avaliação da aptidão reprodutiva do macho canino. Dessa forma, vê-se importância em realizar estudos com essas técnicas visando a aplicação na avaliação andrológica do cão, à fim de proporcionar informações importantes que permitam a sua implementação na investigação reprodutiva da espécie, consequentemente melhorando a abordagem clínica e reprodutiva desses pacientes.

5 CONCLUSION

The present study demonstrates that mpUS provides complementary information on testicular structure, vascularization, mechanical properties, and perfusion, which relate to distinct aspects of semen production and quality in dogs. By integrating ultrasonographic and seminal variables through a multivariate approach, physiologically meaningful patterns emerged that would not be evident through

isolated assessments. Testicular stiffness and DCE-US were particularly informative, reflecting integrated aspects of sperm quality features, while Doppler indices primarily contributed contextual hemodynamic information. Importantly, mpUS should not be viewed as a substitute for a thorough andrological assessment, but it could be seen as a complementary tool that enhances the understanding of male reproductive physiology and supports clinical investigation in andrology. Further studies are necessary to understand if it is possible to establish reference values and cutoff points for mpUS parameters that could accurately distinguish stud dogs regarding their reproductive potential, as well as to investigate the applicability of mpUS in other domestic species and in humans.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Alysson Agostini, Regis Werlang and Andres Enriquez from RTS/Esate Healthcare Brazil, as well as Davide Romano and Chiara Pusillo from Esate Healthcare Italy for the assistance and technical support.

FUNDING

This study was funded by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), grants nº 22/04907-0 and 23/13094-5.

AUTHOR CONTRIBUTION STATEMENT

Luiz Paulo Nogueira Aires: Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Investigation, Data curation, Formal analysis, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Desirée Rodrigues da Silva Alves; Diego Rodrigues**

Gomes; Felipe Farias Pereira da Câmara Barros: Methodology, Investigation, Writing – review & editing. **Vitoria de Oliveira Rodrigues; Gabriel Sousa Santos; Gabriela Castro Lopes Evangelista; Anna Carolina Mazeto Ercolin:** Investigation, Writing – review & editing. **Henricco Zapparoli e Silva; Luan Mendes de Oliveira Bezerra; Isadora Ribeiro De Martino:** Investigation. **André Furugen Cesar de Andrade:** Conceptualization, Methodology, Writing – review & editing. **Marcus Antônio Rossi Feliciano:** Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing, Funding acquisition.

All authors reviewed and approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

- [1] Griswold MD. 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells. *Biol Reprod* 2018;99:87–100. <https://doi.org/10.1093/biolre/iy027>.
- [2] Thumfart KM, Mansuy IM. What are Sertoli cells? Historical, methodological, and functional aspects. *Andrology* 2023;11:849–59. <https://doi.org/10.1111/andr.13386>.
- [3] Root Kustritz MV. The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology*. 2007;68:329–337. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.017>.
- [4] Arlt SP, Reichler IM, Herbel J, Schäfer-Somi S, Riege L, Leber J, et al. Diagnostic tests in canine andrology - What do they really tell us about fertility? *Theriogenology* 2023;196:150–6. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.11.008>.

- [5] Rijsselaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, de Kruif A. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Theriogenology* 2005;64:706–19. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.021>.
- [6] Tanga BM, Qamar AY, Raza S, Bang S, Fang X, Yoon K, et al. Semen evaluation: methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment: a review. *Anim Biosci* 2021;34:1253–1270. <https://doi.org/10.5713/ab.21.0072>.
- [7] Christensen BW, Meyers S. Canine semen evaluation and processing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2023;53:921–930. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2023.05.006>.
- [8] Pinggera GM, Mitterberger M, Bartsch G, Strasser H, Gradl J, Aigner F, et al. Assessment of the intratesticular resistive index by colour Doppler ultrasonography measurements as a predictor of spermatogenesis. *BJU Int* 2008;101:722–726. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2007.07343.x>.
- [9] Zelli R, Troisi A, Elad Ngonput A, Cardinali L, Polisca A. Evaluation of testicular artery blood flow by Doppler ultrasonography as a predictor of spermatogenesis in the dog. *Res Vet Sci* 2013;95:632–637. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.023>.
- [10] de Souza MB, England GCW, Mota Filho AC, Ackermann CL, Sousa CVS, de Carvalho GG, et al. Semen quality, testicular B-mode and Doppler ultrasound, and serum testosterone concentrations in dogs with established infertility. *Theriogenology* 2015;84:805–810. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.015>.

- [11] Trautwein LGC, Souza AK, Cardoso GS, da Costa Flaiban KKM, de Oliveira Dearo AC, Martins MIM. Correlation of testicular artery Doppler velocimetry with kinetics and morphologic characteristics of epididymal sperm in dogs. *Reproduction in Domestic Animals* 2020;55:720–725. <https://doi.org/10.1111/rda.13672>.
- [12] Moxon R, Bright L, Pritchard B, Bowen IM, de Souza MB, da Silva LDM, et al. Digital image analysis of testicular and prostatic ultrasonographic echogenicity and heterogeneity in dogs and the relation to semen quality. *Anim Reprod Sci* 2015;160:112–119. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.07.012>.
- [13] England GCW, Bright L, Pritchard B, Bowen IM, de Souza MB, Silva LDM, et al. Canine reproductive ultrasound examination for predicting future sperm quality. *Reprod Domest Anim* 2017;52:202–207. <https://doi.org/10.1111/rda.12825>.
- [14] Pozza C, Kanakis G, Carlomagno F, Lemma A, Pofi R, Tenuta M, et al. Testicular ultrasound score: A new proposal for a scoring system to predict testicular function. *Andrology* 2020;8:1051–1063. <https://doi.org/10.1111/andr.12822>.
- [15] Gloria A, Di Francesco L, Marruchella G, Robbe D, Contri A. Pulse-wave Doppler pulsatility and resistive indexes of the testicular artery increase in canine testis with abnormal spermatogenesis. *Theriogenology* 2020;158:454–460. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.015>.
- [16] Yavuz A, Yokus A, Taken K, Batur A, Ozgokce M, Arslan H. Reliability of testicular stiffness quantification using shear wave elastography in predicting male fertility: a preliminary prospective study. *Med Ultrason* 2018;20:141–147. <https://doi.org/10.11152/mu-1278>.

- [17] Erdoğan H, Durmaz MS, Özbakır B, Cebeci H, Özkan D, Gökmen İE. Experience of using shear wave elastography in evaluation of testicular stiffness in cases of male infertility. *J Ultrasound* 2020;23:529–534. <https://doi.org/10.1007/s40477-020-00430-5>.
- [18] Gloria A, Bracco C, Di Francesco L, Marruchella G, Contri A. Stiffness estimated by strain elastography reflects canine testicular spermatogenesis and histology. *Theriogenology* 2023;209:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.06.011>.
- [19] Zappone V, Iannelli NM, Sinagra L, Donato G, Quartuccio M, Cristarella S, et al. Assessment of testicular stiffness in fertile dogs with shear wave elastography techniques: a pilot study. *Front Vet Sci* 2024;11:1397347. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1397347>.
- [20] Aires LPN, Gasser B, Del'Aguila-Silva P, Gonçalves JD, Uscategui RAR, Spada S, et al. Multiparametric ultrasound (MPUS) evaluation of the testes of normozoospermic dogs: a pilot study. *Sci Rep* 2025;15:91087. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-91087-9>.
- [21] Sidhu P. Multiparametric ultrasound imaging: terminology describing the many aspects of ultrasonography. *Ultraschall Med* 2015;36:315–317. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1553381>.
- [22] Trautwein LGC, Souza AK, Martins MIM. Can testicular artery Doppler velocimetry values change according to the measured region in dogs? *Reprod Domest Anim* 2019;54:687–695. <https://doi.org/10.1111/rda.13410>.
- [23] Bhide A, Acharya G, Baschat A, Bilardo CM, Brezinka C, Cafici D, et al. ISUOG practice guidelines (updated): use of Doppler velocimetry in obstetrics.

Ultrasound Obstet Gynecol 2021;58:331–339.

<https://doi.org/10.1002/uog.23698>.

- [24] Li XL, Xu HX, Bo XW, Liu BJ, Huang X, Li DD, et al. Value of virtual touch tissue imaging quantification for evaluation of ultrasound breast imaging-reporting and data system category 4 lesions. *Ultrasound Med Biol* 2016;42:1806–1813. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2016.04.002>.
- [25] Ramos DJ, Disselli T, Gomes DR, Aires LPN, Tinto ST, Salazar DVV, et al. Two-dimensional shear-wave elastography of the thyroid in clinically healthy dogs in different age groups. *Animals* 2024;14:1528. <https://doi.org/10.3390/ani14111528>.
- [26] Volta A, Manfredi S, Vignoli M, Russo M, England GCW, Rossi F, et al. Use of contrast-enhanced ultrasonography in chronic pathologic canine testes. *Reprod Domest Anim* 2014;49:202–209. <https://doi.org/10.1111/rda.12250>.
- [27] Quartuccio M, Mangano C, Macri F, Rizzo M, Di Pietro S, Pugliese M, et al. Contrast-enhanced ultrasound evaluation of testicular interstitial cell tumours in conscious non-sedated dogs. *Vet Med (Praha)* 2018;63:125–130. <https://doi.org/10.17221/101/2017-VETMED>.
- [28] Ciciirelli V, Macri F, Di Pietro S, Leoci R, Lacalandra GM, Aiudi GG. Use of contrast-enhanced ultrasound of the testes after non-surgical sterilization of male dogs with CaCl_2 in alcohol. *Animals* 2022;12:577. <https://doi.org/10.3390/ani12050577>.
- [29] Dietrich CF, Averkiou MA, Correias JM, Lassau N, Leen E, Piscaglia F. An EFSUMB introduction into dynamic contrast-enhanced ultrasound (DCE-US) for

- quantification of tumour perfusion. *Ultraschall Med* 2012;33:344–351. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1313026>.
- [30] Mischi M, Den Boer JA, Korsten HHM. On the physical and stochastic representation of an indicator dilution curve as a gamma variate. *Physiol Meas* 2008;29:281–294. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/29/3/001>.
- [31] Averkiou MA, Juang EK, Gallagher MK, Cuevas MA, Wilson SR, Barr RG, et al. Evaluation of the reproducibility of bolus transit quantification with contrast-enhanced ultrasound across multiple scanners and analysis software packages: a quantitative imaging biomarker alliance study. *Invest Radiol* 2020;55:643–656. <https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000702>.
- [32] Dorado J, Rijsselaere T, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M. Influence of sampling factors on canine sperm motility parameters measured by the sperm class analyzer. *Syst Biol Reprod Med* 2011;57:318–325. <https://doi.org/10.3109/19396368.2011.627081>.
- [33] Peter AT, Brito L, Althouse G, Aurich C, Chenoweth P, Fraser N, et al. Andrology laboratory review: evaluation of sperm motility. *Clin Theriogenology* 2021;13:24–36. <https://doi.org/10.58292/ct.v13.9359>.
- [34] de Andrade AFC, Zaffalon FG, Celeghini ECC, Nascimento J, Tarragó OFB, Martins SMMK, et al. Addition of seminal plasma to post-thawing equine semen: what is the effect on sperm cell viability? *Reprod Domest Anim* 2011;46:682–686. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01729.x>.
- [35] Celeghini ECC, de Arruda RP, de Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of

- plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Domest Anim* 2007;42:479–488. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00810.x>.
- [36] de Andrade AFC, de Arruda RP, Celeghini ECC, Nascimento J, Martins SMMK, Raphael CF, et al. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. *Reprod Domest Anim* 2007;42:190–194. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00751.x>.
- [37] Oliveira LZ, de Arruda RP, de Andrade AFC, Celeghini ECC, Reeb PD, Martins JPN, et al. Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. *Anim Reprod Sci* 2013;137:145–155. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.01.010>.
- [38] Leite TG, do Vale Filho VR, de Arruda RP, de Andrade AFC, Emerick LL, Zaffalon FG, et al. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Anim Reprod Sci* 2010;120:31–38. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.04.005>.
- [39] Bracco C, Gloria A, Contri A. Ultrasound-based technologies for the evaluation of testicles in the dog: keystones and breakthroughs. *Vet Sci* 2023;10:683. <https://doi.org/10.3390/vetsci10120683>.
- [40] Davidson AP, Baker TW. Reproductive ultrasound of the dog and tom. *Top Companion Anim Med* 2009;24:36–45. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2008.11.003>.

- [41] England GCW. Relationship between ultrasonographic appearance, testicular size, spermatozoal output and testicular lesions in the dog. *J Small Anim Pract* 1991;32:306–311. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1991.tb00936.x>.
- [42] Lemos H, Dorado J, Hidalgo M, Gaivão I, Martins-Bessa A. Assessment of dog testis perfusion by colour and pulsed-Doppler ultrasonography and correlation with sperm oxidative DNA damage. *Top Companion Anim Med* 2020;41:100452. <https://doi.org/10.1016/j.tcam.2020.100452>.
- [43] Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 1998;9:411–416. <https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0203>.
- [44] O'Donnell L, Smith LB, Rebourcet D. Sertoli cells as key drivers of testis function. *Semin Cell Dev Biol* 2022;121:2–9. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2021.06.016>.
- [45] Wistuba J, Stukenborg JB, Luetjens CM. Mammalian spermatogenesis. *Functional Developmental Embryology* 2007;1:99–117.
- [46] Shin HJ, Kim MJ, Kim HY, Roh YH, Lee MJ. Comparison of shear wave velocities on ultrasound elastography between different machines, transducers, and acquisition depths: a phantom study. *Eur Radiol* 2016;26:3361–3367. <https://doi.org/10.1007/s00330-016-4212-y>.
- [47] Săftoiu A, Gilja OH, Sidhu PS, Dietrich CF, Cantisani V, Amy D, et al. The EFSUMB guidelines and recommendations for the clinical practice of elastography in non-hepatic applications: update 2018. *Ultraschall Med* 2019;40:425–453. <https://doi.org/10.1055/a-0838-9937>.
- [48] Gobello C, Corrada Y. Acquired infertility in male dogs with normal libido. *Compend Contin Educ Pract Vet* 2004;26:196–202.

- [49] Lopate C. Applied animal andrology: dog. In: Chenoweth PJ, Lorton SP, editors. Manual of Animal Andrology. Wallingford: CABI; 2022. p. 160–186. <https://doi.org/10.1079/9781789243505.0011>.