

MARIA ISABEL MELLO MARTINS

**EFEITO DA SAZONALIDADE SOBRE A  
FUNÇÃO TESTICULAR DE CÃES.**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade Estadual Paulista - Campus  
de Botucatu, para a obtenção do título  
de Doutor em Reprodução Animal.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Adj. Maria Denise Lopes

BOTUCATU

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Martins, Maria Isabel Mello.

Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães / Maria Isabel Mello Martins. – Botucatu : [s.n.], 2005.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2005.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Denise Lopes

Assunto CAPES: 50504002

1. Cão. 2. Reprodução animal. 3. Testículos. 4. Testosterona.

CDD 636.0824

Palavras chave: Cães; Perfil protéico; Plasma seminal; Sazonalidade; Testosterona.

## *Dedico*

*Aos meus pais, Maria Helena e Lúcio,  
.... que sempre com um apoio incondicional,  
me incentivam, me auxiliam.  
São um exemplo de amor, seriedade e doação.*

*Tenham certeza, sem vocês nada seria possível!*

# *Agradecimentos*

Confesso ser essa a parte mais difícil desta redação, porque a emoção pode me impedir de lembrar de alguém, e essa foi uma etapa de minha vida de formação profissional que mais auxílio recebi.

*O meu mais sincero agradecimento,*

À Professora Maria Denise Lopes, que me abriu as portas num dos períodos mais difíceis de minha vida profissional, pela confiança, amizade, respeito e apoio.

Aos meus irmãos, sobrinhos, cunhados, minha família, que sempre me incentiva na busca constante de algo mais, compreendem minhas escolhas, minha inquietude. Vocês são especiais....

Às amigas Josmari Pirolo e Carmen Hilst, verdadeiras companheiras, sempre dispostas a ajudar com as aulas, nas trocas de plantões, que me apoiaram deste o início.

Às amigas e equipe de trabalho, Fabiana Ferreira de Souza, Viviane H. Chirinéa, Jussara M. Tebet, pela amizade e paciência, por vocês terem me estimulado, auxiliado, cada uma com sua personalidade e jeito peculiar, (a paciência da Fá, o bom humor da Vivi, a calma da Jú), sempre com carinho.

Aos amigos Suely, Hélio, César, Milton, Peter, Júlio e todos do Departamento de Clínicas Veterinárias da UEL que sempre me estimularam, obrigado por tudo!

Ao Marcelo Gaeta, Maíra e Edvaldo do Canil Von Springer, pela oportunidade de realizar o experimento, pelo auxílio incondicional e pelo carinho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Reprodução Animal, UNESP, Botucatu, pelo auxílio e amizade.

À Professora Eunice Oba, pelo auxílio nas dosagens hormonais, pela amizade.

Ao Professor Paulo Ramos, do Departamento de Física e Biofísica, IB, UNESP, Botucatu, pela amizade e auxílio na eletroforese.

Ao Eugênio do Laboratório de Análises Clínicas, HV, UNESP, Jaboticabal, pela amizade e auxílio nas dosagens de eletrólitos.

Aos amigos de pós-graduação, Thiago, Cris, Marilu, Marcelo, Carla, Zé, Karina, Cassinha, André, Edão, Camila, Bió, Denise, Ian, Leandro, Jorge, Alfredo, Márcia, Noar e todos os outros lembrados e não nomeados, pelas horas de descontração, discussões e companheirismo.

Aos ex-alunos e amigos Klaus, César, Rodrigo, Alessandra, Caco, que embora distantes sempre me incentivaram com carinho e amizade.

À Cristina Silveira que me apresentou o *glamour* do francês, pelo carinho, atenção e amizade.

À família TRAPO (Cebola, Fá, Gui, Gi, Re, João, Dudu, Maria, Walter) pelo carinho, amizade e presença em todos os momentos,... vou sentir falta de Botucatu....

Aos cães, Napo, Hunter, Gold, Sherlock, Nick, Alexandre, Jonny e Colt que sempre me receberam com muito carinho.

À UEL pela oportunidade de capacitação docente.

À CAPES pela concessão da bolsa.

A Deus, por sempre iluminar meu caminho.

E... à Babi, que aturou meu mau humor, cansaço, falta de vontade de passear, ausências constantes, e mesmo assim sempre me recebia feliz com o rabinho abanando.... Saudades... Sinto muito sua falta....

*Muito obrigada!!!!*

*“A humanidade é atraída pelos cães porque eles são muito parecidos conosco: cheios de si, afetivos, confusos, facilmente decepcionáveis, ávidos por serem entretidos, gratos pelas gentilezas e pela mínima atenção”.*

*Pam Brown*

*(poeta neozelandesa contemporânea)*

**SUMÁRIO**

Lista de Tabelas.....	10
Lista de Figuras.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS .....	20
2.1. Objetivo principal.....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
3.1. Fatores sazonais que interferem na reprodução.....	23
3.2. Influência da sazonalidade na reprodução nos machos.....	26
3.2.1. Controle endócrino.....	26
3.2.2. Características seminais.....	29
3.2.3. Congelação do sêmen.....	33
3.2.4. Mensuração prostática e testicular.....	38
3.2.5. Componentes bioquímicos do plasma seminal.....	40
3.2.6. Perfil eletroforético do plasma seminal.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1. Local do Experimento.....	47
4.2. Dados climatológicos.....	47
4.3. Animais.....	48
4.4. Dosagens hormonais.....	49
4.5. Colheita de sêmen.....	50

---

4.6. Análise dos ejaculados.....	51
4.6.1. Análises macroscópicas.....	51
4.6.1.1. Volume.....	51
4.6.1.2. pH.....	51
4.6.2. Análises microscópicas.....	51
4.6.2.1. Motilidade espermática.....	51
4.6.2.2. Vigor.....	52
4.6.2.3. Concentração espermática.....	52
4.6.2.4. Morfologia espermática.....	52
4.7. Criopreservação do sêmen.....	53
4.7.1. Avaliações microscópicas pós-descongelação.....	54
4.7.1.1. Motilidade e vigor espermático.....	54
4.7.1.2. Integridade de membrana espermática.....	54
4.8. Mensuração testicular e prostática.....	55
4.8.1. Ultra-sonografia prostática.....	55
4.8.2. Ultra-sonografia testicular .....	55
4.9. Análise bioquímica do plasma seminal.....	56
4.9.1. Dosagens bioquímicas.....	57
4.9.1.1. Proteínas totais.....	57
4.9.1.2. Cloretos totais.....	58
4.9.1.3. Magnésio.....	59
4.9.1.4. Sódio, Potássio e Cálcio.....	60
4.9.2. Técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida.....	60
4.10. Análise estatística.....	63
5. RESULTADOS.....	65
5.1. Variações climáticas.....	66
5.2. Variações hormonais.....	67
5.3. Variações espermáticas.....	69
5.3.1. Sêmen a fresco.....	69
5.3.2. Sêmen após a congelação.....	73
5.4. Mensuração prostática e testicular.....	74

---

5.5. Componentes bioquímicos do plasma seminal.....	75
5.6. Perfil eletroforético.....	80
5.7. Correlações entre as variáveis estudadas.....	82
6. DISCUSSÃO.....	88
7. CONCLUSÕES.....	103
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
RESUMO.....	122
<i>ABSTRACT</i> .....	123

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1. Variações climáticas\* (média  $\pm$  desvio padrão, valores mínimos/máximos), segundo as estações, no período de 14 meses, no município de Avaré, SP. 66
- Tabela 2. Concentrações séricas médias de testosterona (média  $\pm$  desvio padrão), de amostras colhidas a cada 15 dias, durante 14 meses, de sete (7) cães reprodutores, nas diferentes estações climáticas, no município de Avaré, SP. 67
- Tabela 3. Características espermáticas (média  $\pm$  desvio padrão; valores mínimos/máximos) de oito cães reprodutores por estação, durante 14 meses, nas diferentes estações climáticas, no município de Avaré, SP. 69
- Tabela 4. Valores médios ( $\pm$  desvio padrão; valores mínimos / máximos) das alterações morfológicas espermáticas nos ejaculados de oito cães, durante 14 meses, segundo as estações do ano, no município de Avaré, SP. 73

---

Tabela 5.	Valores médios ( $\pm$ desvio padrão; valores mínimos / máximos) de motilidade, vigor e integridade de membrana de espermatozóides descongelados provenientes de oito cães reprodutores, segundo as estações do ano, no município de Avaré, SP.	74
Tabela 6.	Média ( $\pm$ desvio padrão; valores mínimos/máximos) dos volumes testiculares e da próstata, de oito cães reprodutores, no período de 14 meses, segundo as estações climáticas, no município de Avaré, SP.	75
Tabela 7.	Valores médios ( $\pm$ desvio padrão; valores mínimos / máximos) das concentrações de proteína total, sódio, potássio, cloretos totais, cálcio e magnésio no plasma seminal de oito cães reprodutores, durante 14 meses, segundo as estações climáticas, no município de Avaré, SP.	76
Tabela 8.	Médias da densidade óptica integrada (IOD) das bandas protéicas e seus pesos moleculares (kDa) detectadas no gel de separação de 12%, do plasma seminal de oito cães, nas diferentes estações climáticas, no período de 14 meses, no município de Avaré, SP.	80

---

Tabela 9.	Médias da densidade óptica integrada (IOD) das bandas protéicas e seus pesos moleculares (kDa) detectadas no gel de separação de 18%, do plasma seminal de oito cães, nas diferentes estações climáticas, no período de 14 meses, no município de Avaré, SP.	81
Tabela 10.	Valores do coeficiente de correlação (r) entre as médias das densitometrias ópticas das diferentes bandas protéicas (B), considerando as variáveis seminais: pH, concentração (espermatozóides/mL), número total de espermatozóides (ntotal).	85
Tabela 11.	Valores do coeficiente de correlação (r) entre as médias das densitometrias ópticas das diferentes bandas protéicas (B), considerando as variáveis seminais após a descongelação: motilidade (%), vigor, membranas íntegras (%).	86
Tabela 12.	Valores do coeficiente de correlação (r) entre as médias das densitometrias ópticas das diferentes bandas proteicas (B), considerando as variáveis bioquímicas: cloretos totais (Cl), sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg).	87

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1. Colheita de sêmen pelo método de estimulação digital. 50  
Funil de plástico (A) ou mucosa plástica (B) acoplada a um tubo de plástico calibrado.
- Figura 2. Realização do exame de ultra-som e palpação retal da 56  
próstata (A). Imagem longitudinal prostática (B).
- Figura 3. Avaliação testicular pelo exame de ultra-som (A). 56  
Imagem longitudinal do parênquima testicular (B). A ponta da seta evidencia a rafe testicular.
- Figura 4. Concentração média  $\pm$  desvio padrão de testosterona 68  
(ng/mL) de sete cães, temperaturas máximas e mínimas ( $^{\circ}$ C) e a precipitação ( $\text{mm}^3$ ) durante 14 meses, divididos em estações climáticas.
- Figura 5. Perfil de concentração média  $\pm$  desvio padrão de 68  
testosterona (ng/mL) de cada um dos sete cães, ao longo de 14 meses, divididos em estações climáticas.

- 
- Figura 6. Volume médio ( $\pm$  desvio padrão) do ejaculado de oito cães reprodutores, temperatura máxima e mínima ( $\times 10^\circ\text{C}$ ) e a precipitação ( $\text{mm}^3$ ), no período de 14 meses, segundo a estação do ano, no município de Avaré, SP. 70
- Figura 7. Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de pH do ejaculado de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $\times 10^\circ\text{C}$ ) e a precipitação ( $\text{mm}^3$ ), no período de 14 meses, segundo a estação do ano, no município de Avaré, SP. 70
- Figura 8. Motilidade média ( $\pm$  desvio padrão) do ejaculado de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $^\circ\text{C}$ ) e a precipitação ( $\text{mm}^3$ ), durante 14 meses, segundo as estações do ano, no município de Avaré, SP. 71
- Figura 9. Vigor espermático médio ( $\pm$  desvio padrão) do ejaculado de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $\times 10^\circ\text{C}$ ) e a precipitação ( $\text{mm}^3$ ), durante 14 meses, segundo as estações do ano, no município de Avaré, SP. 71
- Figura 10. Concentração espermática média ( $\pm$  desvio padrão) no ejaculado de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $^\circ\text{C}$ ) e a precipitação ( $\text{mm}^3$ ), durante 72

---

14 meses, segundo as estações do ano, no município de Avaré, SP.

- Figura 11. Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) do número total de espermatozoides no ejaculado de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $^{\circ}\text{C}$ ) e a precipitação ( $\text{mm}^3$ ), durante 14 meses, segundo as estações do ano, no município de Avaré, SP. 72
- Figura 12. Concentrações médias ( $\pm$  desvio padrão) de proteína total no plasma seminal de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $\times 10^{\circ}\text{C}$ ) e a precipitação pluviométrica ( $\text{mm}^3$ ), durante 14 meses, segundo as estações climáticas, no município de Avaré, SP. 77
- Figura 13. Concentrações médias ( $\pm$  desvio padrão) de sódio no plasma seminal de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $^{\circ}\text{C}$ ) e a precipitação pluviométrica ( $\text{mm}^3$ ), durante 14 meses, segundo as estações climáticas, no município de Avaré, SP. 77
- Figura 14. Concentrações médias ( $\pm$  desvio padrão) de potássio no plasma seminal de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $^{\circ}\text{C}$ ) e a precipitação pluviométrica 78

---

(mm<sup>3</sup>), no período de 14 meses, segundo as estações climáticas, no município de Avaré, SP.

- Figura 15. Concentrações médias ( $\pm$  desvio padrão) de cloretos totais no plasma seminal de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $\times 10^{\circ}\text{C}$ ) e a precipitação pluviométrica (mm<sup>3</sup>), no período de 14 meses, segundo as estações climáticas, no município de Avaré, SP. 78
- Figura 16. Concentrações médias ( $\pm$  desvio padrão) de cálcio no plasma seminal de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $\times 10^{\circ}\text{C}$ ) e a precipitação pluviométrica (mm<sup>3</sup>), no período de 14 meses, segundo as estações climáticas, no município de Avaré, SP. 79
- Figura 17. Concentrações médias ( $\pm$  desvio padrão) de magnésio no plasma seminal de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $\times 10^{\circ}\text{C}$ ) e a precipitação pluviométrica (mm<sup>3</sup>), no período de 14 meses, segundo as estações climáticas, no município de Avaré, SP. 79



## *INTRODUÇÃO*

## 1. INTRODUÇÃO

Achados arqueológicos indicam que o cão doméstico existe há pelo menos 14.000 anos e que a sua domesticação ocorreu, inicialmente, na Europa e Ásia Ocidental, muito antes das outras espécies animais (JOHNSTON, 2000; WILLS & ROBSON, 2000).

De acordo com estudos genéticos recentes, acredita-se que os lobos são vinte vezes mais relacionados aos cães do que o seu parente selvagem mais próximo, o coiote. Alguns pesquisadores consideram o cão doméstico mais uma subespécie do lobo (JOHNSTON, 2000).

Ao selecionar os traços desejáveis nos lobos adultos mais mansos, o homem primitivo estava inconscientemente manipulando a população reprodutora e, portanto, iniciando o processo de domesticação. Uma redução geral no tamanho do corpo é a principal característica da domesticação e pode estar relacionada, em parte, às restrições dietéticas impostas no cativeiro (WILLS & ROBSON, 2000).

Nas espécies selvagens o período de reprodução é determinado para que os nascimentos ocorram nas estações com melhores condições ambientais para a sobrevivência (FORSBERG et al., 1989). Com a domesticação, a proteção dos animais contra as condições ambientais mais adversas promoveu a diminuição ou supressão de muitas das expressões fisiológicas sazonais (THIÉRY et al., 2002).

---

A partir do século XVIII na Europa, com o domínio do homem sobre a natureza, iniciou-se a aplicação de biotécnicas na reprodução dos cães e o desenvolvimento de novas raças (WILLS & ROBSON, 2000).

Apesar dos primeiros sucessos com a inseminação artificial de cães datarem de mais de três séculos, ainda nos tempos atuais muito pouco é conhecido em relação aos fatores que dificultam a preservação do gameta masculino, os quais podem alterar as características bioquímicas do plasma seminal, entre eles o efeito da sazonalidade.

Na literatura científica, a influência da sazonalidade na reprodução de caninos domésticos em climas temperados é escassa e em condições tropicais não foi estudada.

Com o intuito de preencher essas lacunas científicas existentes na reprodução de cães, criados em clima tropical, foi proposto testar a seguinte hipótese: existe um padrão sazonal na função testicular de cães considerando a região sudeste do Brasil?



## *OBJETIVOS*

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Principal:**

- ✓ Identificar a ocorrência de um padrão sazonal na função testicular de cães, mantidos sob fotoperíodo natural.

### **2.2. Objetivos Específicos:**

- ✓ Verificar variação do padrão hormonal de testosterona no período de 14 meses.
- ✓ Identificar a variação na qualidade espermática, pré e pós congelação, do sêmen de cães no período de 14 meses.
- ✓ Identificar a variação do volume e do parênquima prostático e dos testículos de cães ao longo de 14 meses.
- ✓ Identificar a variação das proteínas totais, sódio, potássio, cloretos totais, cálcio, magnésio e perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal de cães no período de 14 meses.
- ✓ Determinar o padrão eletroforético das proteínas do plasma seminal no período de 14 meses.
- ✓ Identificar a correlação entre as diversas variáveis analisadas e as condições climáticas.
- ✓ Identificar a correlação entre o perfil eletroforético das proteínas e eletrólitos do plasma seminal e a qualidade do sêmen.



## *REVISÃO DA LITERATURA*

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1. FATORES SAZONAIS QUE INTERFEREM NA REPRODUÇÃO**

A seleção natural sempre favorece aqueles mamíferos adaptados às variações ambientais e que se reproduzem em harmonia com o ambiente explorado. De uma forma ou de outra, a maioria dos animais exhibe, no mínimo, uma tendência à sazonalidade, sendo que muitas espécies se reproduzem somente durante um período restrito do ano. Pois sabe-se que em animais de vida livre, as demandas que competem mais intensamente com a reprodução são a manutenção celular, a termorregulação e o gasto na locomoção associado à procura de alimento (BRONSON & HEIDEMAN, 1994).

Diferentes interferências do fotoperíodo na regulação sazonal da reprodução têm sido documentadas em espécies mamíferas (BRONSON & HEIDEMAN, 1994).

Na região equatorial o fotoperíodo e a temperatura são importantes fatores que podem influenciar no ciclo reprodutivo de diferentes espécies. O efeito do fotoperíodo envolve pelo menos dois mecanismos separados. Primeiro, existe uma ação direta sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário e segundo, existe uma modificação simultânea na sensibilidade do sistema nervoso central para o mecanismo retrógrado negativo dos esteróides (BLACSHAW, 1977; HAFEZ, 1987).

---

Em espécies sazonais, o fotoperíodo é um estímulo primário para a liberação de GnRH. Na ausência de grandes modificações ambientais, o ritmo endógeno da atividade hipotalâmica pode controlar a liberação de gonadotrofinas e o desenvolvimento gonadal (BLACKSHAW, 1977).

As informações de fotoperíodo são capturadas na retina e transportadas por fibras nervosas para a glândula pineal, a qual vai inibir a produção de melatonina. Em eqüinos, a produção de melatonina é inibida durante os dias longos (SAMPER, 1997).

A melatonina é sintetizada e liberada de forma rítmica, no período de escuridão do ciclo dia-noite. A sua produção é controlada por um sistema endógeno circadiano e é suprimida pela luz. A duração da secreção pulsátil de melatonina aumenta com a duração da noite, promovendo dessa maneira um calendário interno que regula ciclos sazonais na reprodução e outras funções nas espécies fotoperiódicas (MACCHI & BRUCE, 2004).

O aumento no período diário de secreção de melatonina está associado com a diminuição na liberação de GnRH, conseqüentemente ocorre a regressão das gônadas de animais de estacionalidade reprodutiva em dias longos. Inversamente, esse sinal de melatonina é seguido por uma ativação das gônadas nos animais de reprodução em dias curtos (GROSSE et al., 1993).

Dessa maneira, em eqüinos os baixos níveis circulantes de melatonina são coincidentes com altos níveis de GnRH e gonadotrofinas (SAMPER, 1997). Em carneiros, a melatonina provoca variação na ação da testosterona como

---

hormônio inibidor da secreção de GnRH e das gonadotrofinas, (FITZGERALD, 1997).

Apesar da espécie humana não ser considerada fotoperiódica, a ocorrência de desordens afetivas sazonais (SAD) e o sucesso do tratamento com luminosidade, sugere que alguma resposta ao fotoperíodo é mantida. Dados recentes demonstram uma associação entre os níveis de melatonina endógena e o início da puberdade, assim como níveis elevados desse hormônio em homens e mulheres com hipogonadismo e/ou infertilidade (MACCHI & BRUCE, 2004).

A atividade sexual em todos os mamíferos selvagens varia de acordo com as estações do ano. Estudos experimentais demonstram que a variação do número de horas de luz diária é o que mais influencia a atividade sexual (HAFEZ, 1987).

Na Europa, o início da atividade reprodutiva no macho da raposa vermelha tem sido relacionado ao fotoperíodo. Em altas latitudes (maiores de 60°N), a fertilidade máxima é encontrada com o aumento do comprimento do dia, enquanto que nas baixas latitudes (menores de 50°N) a fertilidade está associada com a diminuição do dia (LOYD & ENGLUND, 1973).

A influência do fotoperíodo na regulação sazonal da reprodução, provavelmente desapareça em animais que vivem abaixo da latitude 30°. Nessas regiões, a variação sazonal na temperatura ambiente é muito menor, entretanto existe uma marcada variação sazonal na precipitação pluviométrica (BRONSON & HEIDEMAN, 1994).

---

Num estudo realizado por FORSBERG et al. (1989), no hemisfério norte, foi observado que os machos do lobo-prata (*Vulpes vulpes*) apresentavam um padrão reprodutivo sazonal, com a atividade testicular variando consideravelmente durante o ano, com o pico da capacidade reprodutiva durante os meses de fevereiro e março.

Entretanto, TAHA et al. (1981) pesquisando o efeito da sazonalidade em cães domésticos, no hemisfério norte, detectaram grandes variações nas concentrações de testosterona entre os indivíduos, mas não variações sazonais.

## **3.2. INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NA REPRODUÇÃO DOS MACHOS**

### **3.2.1. CONTROLE ENDÓCRINO**

A fisiologia reprodutiva masculina é controlada, endocrinologicamente, por duas gonadotrofinas secretadas pela hipófise anterior, LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo estimulante). A secreção de gonadotrofinas é dependente do controle positivo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que é liberado em pulsos pelo hipotálamo e que se liga a receptores específicos na membrana plasmática da hipófise anterior. O GnRH sofre controle negativo da testosterona e de seus metabólitos ativos, o sulfato de estrona e a dihidrotestosterona. O "feed back" negativo ocorre tanto ao nível hipofisário como hipotalâmico. Também sofre controle negativo

---

do estradiol, produzido no testículo pela aromatização da testosterona (DEPALATIS et al., 1978; AMANN, 1986; HAFEZ, 1987; HEWITT, 1998).

A secreção de FSH é estimulada pelo GnRH e controlada pela inibina, uma glicoproteína secretada pelas células de Sertoli, em resposta a sinais das células germinativas (HAFEZ, 1987; SETCHELL, 1993).

O LH estimula a produção e secreção de testosterona pelas células de Leydig. O FSH se liga às células de Sertoli e estimula a produção da proteína fixadora de andrógenos – ABP, a qual é secretada na luz do túbulo seminífero, se liga à dihidrotestosterona, a forma bioativa da testosterona, ajudando a manter nível alto de testosterona dentro do túbulo (HAFEZ, 1987; SAMPER, 1997; HEWITT, 1998).

Todo mecanismo de controle endócrino da reprodução nos machos pode sofrer influência da sazonalidade. As alterações de luminosidade diária, eventualmente, desencadeiam variações nos níveis plasmáticos de gonadotrofinas e de prolactina. Nos ovinos, uma redução nas 16 horas diárias de luminosidade para 8 horas é seguida por uma diminuição da prolactina e um aumento paralelo de FSH-LH, e conseqüentemente por uma elevação da testosterona e do peso testicular (HAFEZ, 1987; SETCHELL, 1993).

Em homens, REINBERG et al. (1988) demonstraram picos de LH, testosterona e estradiol no outono, relacionados com a concentração espermática, e pico de FSH e 20  $\alpha$ -dihidrotestosterona no verão. Esses pesquisadores sugerem um fator potencial comum conduzindo mudanças sazonais na concentração espermática e na produção de andrógenos.

---

Tem sido documentado que a mensagem de fotoperiodismo dentro da maioria dos animais é conduzida pelo hormônio da pineal, a melatonina. Entretanto, a despeito da evidência da influência do fotoperíodo na família Canidae, tem sido sugerido por ASA et al. (1987) que o controle sazonal da reprodução no lobo prata deve basear-se num outro sistema que não a glândula pineal. Esses autores realizaram a exérese da pineal e do gânglio cervical superior em lobos machos e fêmeas pré-púberes e observaram que o início da puberdade não foi alterada, sendo que todos os animais exibiram um ciclo reprodutivo normal, quando comparados àqueles não submetidos à cirurgia.

KREEGER et al. (1990) demonstraram que a retirada da pineal de lobos prata não alterou o ritmo circanual da prolactina, enquanto que o fornecimento de melatonina deprimiu significativamente os níveis de prolactina.

A secreção de LH em cães machos é pulsátil com picos ocorrendo em intervalos de 1,5 a 5 horas, seguida por aumento nos níveis de testosterona 60 minutos após. Em cães intactos, a concentração média de testosterona variou de 0,4 a 6,0 ng/mL durante o período de 24 horas (DEPALATIS et al., 1978).

FALVO et al. (1980) sugeriram a possibilidade de uma sazonalidade ancestral em machos de cães mestiços. A mensuração de LH e testosterona sérica indicou alteração no padrão anual cíclico da secreção de LH e um significativo pico na testosterona durante o outono.

---

Variações sazonais têm sido reportadas nas concentrações de LH (1,0 - 1,2 ng/mL a 3,8 – 10,0 ng/mL) e testosterona (0,5 – 1,5 ng/mL e picos de até 3,5 – 6,0 ng/mL) em cães, mas embora haja uma relação entre a secreção dos dois hormônios, as influências sazonais sobre eles são independentes. Acredita-se que a prolactina tenha ação sinérgica com o LH, regulando a produção de testosterona, pois receptores para prolactina estão presentes nas células de Leydig (HEWITT, 1998).

### **3.2.2. CARACTERÍSTICAS SEMINAIS**

A avaliação da qualidade do sêmen compreende as características físico-químicas e macro e microscópica. No cão, a motilidade e o vigor espermáticos, concentração de espermatozóide, alterações morfológicas e integridade da membrana espermática são as principais características seminais avaliadas. Antes de caracterizar as possíveis variações sazonais, devem ser considerados os valores normais.

O ejaculado canino é dividido em três frações diferenciadas. A primeira é a fração pré-espermática, de origem prostática, possui um aspecto aquoso e transparente, um volume que varia de 0,5 a 5,0 mL. A segunda fração é rica em espermatozóides, a coloração varia de branco leitoso a translúcido, dependendo da concentração; e o volume varia de 1,0 a 4,0 mL (JOHNSTON et al., 2001). A terceira fração é também de origem prostática, de aspecto aquoso, transparente, volume variando de 2,5 a 80,0 mL e possui a função de facilitar o transporte espermático pela cervix e aumentar o volume do ejaculado (ENGLAND & ALLEN, 1992).

---

O volume total do ejaculado varia de 1,0 a 80,0 mL, tem a osmolaridade ao redor de 320 mOsm e pH de 6,4 a 6,6. O pH normal varia entre 6,3 a 7,0 e depende da quantidade de líquido prostático colhido (AMANN, 1986, JOHNSTON et al., 2001).

A motilidade espermática de uma amostra de sêmen fresco de cão deve ser no mínimo de 70% (LINDE-FORSBERG, 1991). O movimento espermático pode ser avaliado subjetivamente em microscópio de contraste de fase ou num analisador computadorizado (HTR – IVOS 10 ANALYSER, Hamilton Thorn Research), o qual é mais preciso e informa características diversas do movimento. Esse sistema determina a motilidade espermática total, motilidade total progressiva, padrão médio de velocidade espermática (VAP), velocidade de deslocamento em linha reta (VSL), velocidade de deslocamento curvilíneo (VCL), sobreposição do deslocamento retilíneo e a do deslocamento curvilíneo (STR) e ainda a linearidade do movimento dos espermatozóides (LIN) (IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001).

O número total de espermatozóides num ejaculado canino varia de 300 milhões a 2 bilhões e é dependente da raça, da idade e da frequência de colheita (JOHNSTON et al., 2001).

A morfologia espermática (cabeça, acrossomo, peça intermediária e cauda) determina os defeitos maiores, menores e o total de defeitos. Segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), a proporção de defeitos maiores e menores no sêmen do cão deve ser no máximo 20%, sendo que o total de defeitos maiores não deve ser superior a 10%.

---

A integridade de membrana espermática pode ser avaliada por sondas fluorescentes (diacetato de 6-carboxifluoresceína e iodeto de propídio), que é uma técnica descrita por HARRISON & VICKERS (1990), e modificada para utilização em cães por CUNHA et al. (1996). Esse tipo de método é capaz de avaliar a presença de rupturas na membrana espermática como resultado da lesão celular.

A qualidade espermática é influenciada por vários fatores externos, alguns dos quais são sazonais. Em homens normais, nas latitudes 69°N e 60°N, embora tenha sido detectada uma concentração maior ( $p=0,02$ ) de inibina B no inverno, quando comparado ao verão, não houve mudanças substanciais na concentração e motilidade espermáticas (MALM et al., 2004).

Porém em homens, com fertilidade comprometida, a espermatogênese e a qualidade espermática podem sofrer influência negativa adicional, quando a temperatura testicular e a exposição diária à luz são alteradas (KÜNZLE et al., 2004).

Adicionalmente, homens inférteis apresentam baixa motilidade espermática total e progressiva durante a primavera, quando comparada ao verão. Além disso, diferenças sazonais também foram observadas quanto à morfologia espermática, sendo a porcentagem de formas estreitas significativamente maior no outono que na primavera. Isto pode estar relacionado às altas temperaturas observadas no verão, quando o espermatozóide foi formado no testículo e subsequentemente, maturado e diferenciado no epidídimo. Por outro lado, defeitos de cauda foram maiores na primavera, talvez como resultado dos efeitos do frio ocorridos no inverno e

---

na primavera. Já que o ciclo da espermatogênese tem duração de 75 a 90 dias, esses dados podem ser justificados pelos efeitos da temperatura ambiente terem sido manifestados somente no final da estação (CENTOLA & EBERLY, 1999).

Embora os eqüinos, ovinos e caprinos tenham a capacidade de reproduzir-se o ano todo, ocorre uma interferência sazonal na espermatogênese com melhora na quantidade e qualidade do sêmen durante a estação de monta (HOFFMANN & LANDECK, 1999; KARAGIANNIDIS et al., 2000a, 2000b).

Com o objetivo de detectar os efeitos das variações sazonais na qualidade do sêmen canino, KURODA & HIROE (1972) avaliaram ejaculados de 10 cães na primavera, verão, outono e inverno e observaram que a qualidade do sêmen foi melhor na primavera e pior no verão, com volume de 9,4mL *versus* 7,0mL, concentração  $267 \times 10^6$  *versus*  $207 \times 10^6$  espermatozóides/mL, concentração total  $437 \times 10^6$  *versus*  $369 \times 10^6$  espermatozóides, motilidade 91% *versus* 88% e porcentagem de espermatozóides anormais 5,4% *versus* 7,0%, respectivamente. Resultados semelhantes (motilidade espermática, 85% na primavera *versus* 78% no verão; concentração espermática,  $7,32 \times 10^8$  na primavera *versus*  $4,63 \times 10^8$  espermatozóides/mL no verão) foram obtidos por TAKEISHI et al. (1975) ao avaliar cães mestiços. Estes autores atribuíram a baixa qualidade do sêmen às altas temperaturas do verão (máxima 25°C).

A estação do ano, em clima temperado, também tem efeitos na concentração de espermatozóides no ejaculado de cães, apesar de ter sido

---

observada uma variação individual, ocorreu aumento na concentração espermática durante a primavera e início de verão ( $247 \times 10^6$  a  $659 \times 10^6$  espermatozoides/mL) e uma queda no final do verão e outono ( $230 \times 10^6$  a  $560 \times 10^6$  espermatozoides/mL) (TAHA et al., 1981). Embora estes autores tenham encontrado essa variação na concentração espermática, o número total de espermatozoides no ejaculado encontra-se dentro da variação normal para a espécie ( $>200 \times 10^6$  espermatozoides). Isso indica que o cão normal pode ser considerado fértil independente da estação do ano ou temperatura ambiente (AMANN, 1986; FELDMAN & NELSON, 1996).

SCHÄFER et al. (1997) realizaram colheitas de sêmen de cães, durante um período de seis meses. Observaram o aumento do volume das frações pré e pós-espermáticas, o aumento da motilidade e a diminuição das alterações morfológicas espermáticas durante a primavera. E concluíram que pode ter ocorrido uma influência da grande umidade e luminosidade crescente desse período, ou estar relacionado com um número maior de fêmeas em estro no canil.

### **3.2.3. CONGELAÇÃO DO SÊMEN**

Apesar da inseminação artificial (IA) em cães domésticos ter crescido nas últimas décadas, os estudos já realizados ainda não proporcionam um modelo ideal para a criopreservação do sêmen de espécies domésticas e selvagens ameaçadas de extinção.

Segundo ENGLAND (1993), foi SPALLANZANI, em 1776, o primeiro a observar que a diminuição na temperatura reduzia, reversivelmente, a

---

atividade metabólica dos espermatozóides, permitindo dessa forma sua estocagem. Em 1949, a descoberta da ação crioprotetora do glicerol, por POLGE et al. proporcionou um significativo impacto na metodologia da criopreservação de células. Entretanto, somente em 1954 ROWSON obteve sucesso com a congelação do sêmen, nessa espécie. Posteriormente, SEAGER, em 1969, relatou a primeira gestação numa cadela, a partir da IA com sêmen congelado.

Desde então, o procedimento de criopreservação das células espermáticas vem sendo empregado na espécie canina. Atualmente, os métodos têm sido baseados nas cinco etapas descritas por HAMMERSTEDT et al. (1990): 1) diluição e refrigeração; 2) penetração do crioprotetor e envasamento; 3) congelação; 4) armazenamento e 5) descongelação.

Independente da espécie, os diluentes usados para congelação de sêmen devem possuir: nutrientes como uma fonte de energia para o metabolismo espermático (glicose, frutose, lactose); um tampão contra mudanças deletérias de pH e possuir osmolaridade e concentração de eletrólitos fisiológicas (TRIS – ácido cítrico, TES - citrato, glicina); antibióticos para prevenir o crescimento bacteriano (penicilina, estreptomicina, neomicina); gema de ovo e leite para proteger do choque térmico durante a refrigeração; e possuir crioprotetores (glicerol, etilenoglicol e outros) para reduzir os danos aos espermatozóides resultantes da congelação e descongelação (LINDE-FORSBERG, 1991; ENGLAND, 1993; BATEMAN, 2001).

Dentre estes componentes existem diversas formulações destinadas para cada espécie. No cão, açúcares como a glicose, dextrose e lactose são

---

descritos como fonte de energia (JOHNSTON, 2001). A glicose ou a frutose está presente na grande maioria dos diluidores utilizados para sêmen de cães (SILVA et al., 1996; HAY et al., 1997; ROTA, 1998; PEÑA & LINDEFORSBERG, 2000).

A utilização do TRIS (Tris-hidroximetil-aminometano) como tampão, para neutralizar o pH ácido do meio diluente, tem apresentado os melhores resultados de motilidade (BATTISTA et al., 1989; OLAR et al., 1989; ENGLAND, 1993; THOMAS et al., 1993; SANTOS et al., 1999).

A contaminação microbiana pode afetar negativamente a fertilidade, devido à presença de bactérias e toxinas geradas pela degradação dos componentes de origem biológica do meio ou pela utilização de alguns substratos metabólicos (WATSON, 1990). PEÑA (1999) numa revisão demonstrou que a neomicina, cloranfenicol, ampicilina, eritromicina, tilosina são eficazes e não são tóxicos às células espermáticas. A associação clássica de penicilina e estreptomicina é uma preparação eficaz e é a mais utilizada nos diluentes seminais. Em estudo realizado por SANTOS et al. (2003) com meios diluentes utilizados na congelação de sêmen eqüino, não foi observado crescimento bacteriano ou diferenças significativas na motilidade e integridade de membrana pós-descongelação quando diferentes antimicrobianos (penicilina, streptomicina, gentamicina, ampicilina, amicacina e suas associações).

A gema de ovo tem sido utilizada para proteção contra o choque térmico, na maioria dos diluentes. Diversas concentrações foram testadas e, atualmente, 20% de gema de ovo tem sido adicionado como padrão nos

---

meios destinados ao sêmen de cães (FOOTE & LEONARD, 1964; FONTBONNE & BADINAND, 1993; RODRIGUES-MARTINES et al., 1993; NÖTHLING et al., 1995; SILVA et al., 1996; PEÑA & LINDE-FORSBERG, 2000).

Os crioprotetores, incluindo o glicerol, causam inicialmente desidratação da célula por induzir a saída de água (WATSON, 1995). A adição do glicerol aos meios diluentes reduz as injúrias da criopreservação. A concentração ideal de glicerol adicionada ao meio é uma compensação entre os efeitos de proteção e os efeitos adversos. Uma variação entre 2% e 8% de glicerol tem sido descrita na literatura. Porém, PEÑA et al. (1998) observaram que tanto a motilidade pós-descongelção, como a integridade do acrossoma, foram superiores após o uso de um meio diluente contendo 8% de glicerol quando comparado com 2%, 4% e 6%. Segundo FONTBONNE & BADINAND (1993) e PEÑA et al. (1998) a temperatura de glicerolização não afeta a qualidade espermática pós-descongelção. Portanto, a adição do glicerol pode ser feita antes, durante ou no final da refrigeração (OLAR et al., 1989; HAY et al., 1997).

Atualmente, a adição de detergentes, como o SDS (dodecil sulfato de sódio) como um dos componentes do Equex STM Paste® (Nova Chemical Sales, Scituate Inc., M.A., EUA) e Orvus es Paste® (Proctor & Gamble, Cincinnati, OH, EUA) no meio diluente tem sido preconizada, pelos seus benefícios, favorecendo a ação dos fosfolipídeos da gema de ovo e aumentando a proteção do espermatozóide contra o choque térmico (ROTA et al., 1997; HOLT, 2000; PEÑA & LINDE-FORSBERG, 2000; PEÑA et al., 2003).

---

Vários períodos de refrigeração e congelação têm sido descritos para os canídeos (FONTBONNE & BADINAND, 1993; SILVA et al., 1996), sendo dependente do método de envasamento (ROTA, 1998). De acordo com HAMMERSTEDT et al. (1990), se a taxa de congelação utilizada for rápida, deve-se utilizar uma descongelação rápida, para que não ocorram danos à membrana plasmática e organelas celulares.

Embora exista uma variabilidade individual intensa das células espermáticas de cães, frente aos efeitos da criopreservação, não tem sido estudada a influência da sazonalidade sobre a qualidade espermática pós-descongelação.

As poucas informações disponíveis em canídeos são de FORSBERG et al. (1989) que observaram em lobos-prata baixa qualidade e pouca capacidade de fertilização do sêmen congelado no período de verão. Esses resultados foram relacionados ao calor, já que no início do verão, quando os dias são quentes (20° a 25°C), os machos ainda permanecem com a pelagem de inverno.

Estudos conduzidos em búfalos identificaram que a motilidade pós-descongelação foi menor no verão e maior no inverno, concluindo que o espermatozóide pode ser frágil durante o verão e não suporta os efeitos da congelação (BAHGA & KHOKAR, 1991). Em eqüinos, de duas raças diferentes, JANETT et al. (2003a, 2003b) verificaram maior motilidade e viabilidade do sêmen após a descongelação, durante o outono, em condições climáticas de 46°49'N, 06°57'E.

### **3.2.4. MENSURAÇÃO PROSTÁTICA E TESTICULAR**

A próstata é a única glândula sexual acessória do cão e é responsável pela produção do fluido prostático para o transporte e sustentação dos espermatozoides na ejaculação (BARSANTI & FINCO, 1989). A posição da glândula depende da idade, da distensão da bexiga e do estado de alteração da glândula (BARSANTI e FINCO, 1992).

A função da próstata é participar no controle da eliminação de urina pela bexiga e na secreção de fluido seminal durante a ejaculação; auxiliar no metabolismo da testosterona a dihidrotestosterona, influenciando na função hipotalâmica e hipofisária (GRIFFITHS et al., 1991). O crescimento prostático é regulado pela 5- $\alpha$ -dihidrotestosterona, que é formada pela conversão da testosterona circulante por ação da 5- $\alpha$ -redutase, dentro das células epiteliais prostáticas (EWING et al., 1983).

No cão, a textura ecográfica e as dimensões prostáticas podem ser avaliadas pelo exame ultra-sonográfico (FEENEY et al., 1987). Estudos têm demonstrado que a próstata pode apresentar-se sob a forma elíptica ou globosa e que existe uma tendência a maiores dimensões da glândula em animais idosos. Adicionalmente, a palpação retal da próstata pode determinar a localização, forma, simetria dos lóbulos e sensibilidade do órgão (SOUZA et al. 2002).

GOERITZ et al. (2003) avaliando a reprodução sazonal de veados, detectaram por exames de ultra-som, realizados mensalmente, que houve alterações circanuais pronunciadas na próstata e vesícula seminal. Também

---

observaram diferenças marcantes nos parâmetros morfológicos testiculares entre as estações de reprodução e não reprodução.

Em relação aos testículos, cerca de 80% da produção diária de espermatozoides é atribuída ao peso ou tamanho testicular ( $r=95$ ,  $p<0,01$ ), o qual é influenciado pelo peso corpóreo do animal. Em média, as dimensões testiculares são de 3cm x 2cm x 1,5cm (comprimento x largura x altura) (OLAR et al., 1983; AMANN, 1986; HEWITT, 1998).

Em um estudo com cães domésticos, a variação do tamanho testicular não foi correlacionada às mudanças da proporção de nenhum componente tecidual e a proporção de túbulos seminíferos (epitélio germinal+lúmen) permaneceu constante mesmo na grande variação de tamanho testicular (WOODAL & JOHNSTONE, 1988).

Os testículos podem ser mensurados pelo ultra-som ou com o paquímetro. A mensuração testicular pela ultra-sonografia é mais acurada, porém não existe diferença entre os dois métodos (EILTS et al., 1993).

Em muitas espécies, a mensuração do volume testicular e/ou nível sérico de testosterona tem sido utilizada para avaliar a influência das condições climáticas sobre a atividade endócrina testicular (JOHNSTON et al. 1994; WALKER, 1999).

BICUDO (1998) estudando o efeito da sazonalidade em carneiros da raça Ideal, na região de Botucatu, detectou uma diminuição na biometria testicular nos meses de inverno. Entretanto, essa alteração não foi suficiente para determinar uma pausa na atividade reprodutiva desses animais.

Mudanças sazonais no tamanho testicular têm sido reportadas em muitos canídeos não domésticos. GOODROWE et al. (1998) reportaram, em clima temperado, no hemisfério norte, uma combinação da diminuição no tamanho testicular e peso testicular, em lobos vermelhos, nos meses de primavera (fevereiro e março).

### **3.2.5. COMPONENTES BIOQUÍMICOS DO PLASMA SEMINAL**

A função espermática é altamente dependente dos componentes iônicos presentes no meio (HAMAMAH & GATTI, 1998). O plasma seminal, no ejaculado canino, origina-se dos epidídimos e da glândula prostática.

Análises bioquímicas do plasma seminal não fracionado, realizadas por BARTLETT (1962), detectaram pH 6,4; concentrações de sódio (72,0 a 180,0 mEq/L), potássio (7,9 a 8,2 mEq/L), cálcio (0,4 a 1,0 mEq/L), magnésio (0,3 a 0,8 mEq/L), cloretos (152mEq/L) e proteínas (1,74 a 2,1 g/dL).

Em estudos realizados por CHATTERJEE et al. (1976) foram detectadas variações nos eletrólitos do plasma seminal de cães, nas concentrações de sódio (116,4 a 218 mEq/L), potássio (4,4 a 14,1 mEq/L), cálcio (1,8 a 4,4 mEq/L), magnésio (0,9 a 2,15 mEq/L) e pH (6,4 a 6,9). Posteriormente, valores semelhantes para o sódio (134,4 a 156,0 mEq/L) e potássio (7,8 a 13,7 mEq/L) foram encontrados na raça Pastor Alemão por SOUZA et al. (1995).

SOUZA (2003) determinou concentrações de proteínas totais (2,19 g/dL), de cloretos totais (180,18 mEq/L), de cálcio (0,80 mg/dL), de potássio

---

(11,76 mEq/dL) e de sódio (146,93 mEq/dL) no plasma seminal de 20 cães mestiços com pH médio de 6,67.

Reveste-se ainda de grande importância o conhecimento dos fatores, ou substâncias, que parecem desestabilizar ou proteger a membrana dos espermatozoides, uma vez que a integridade da mesma é fundamental para o funcionamento adequado do gameta masculino (PARKS & GRAHAM, 1992).

O plasma seminal contribui com fatores pró e contra a fertilidade dos espermatozoides (KILLIAN et al., 1993; BELLIN et al., 1994). Dentre os elementos bioquímicos, as proteínas do plasma seminal têm sido correlacionados à fertilidade.

Durante a espermatogênese, os espermatozoides perdem a capacidade de sintetizar e secretar proteínas (SHABANOWITZ & KILLIAN, 1987). Entretanto, novas proteínas são aderidas à membrana espermática pela interação dessas células com o meio, seja esse o fluido epididimal, fluido do ducto deferente e, durante a ejaculação, o plasma seminal (NAABY-HANSEN et al., 1997; TULSIANI et al., 1997). A ligação dessas proteínas à membrana é irreversível, como demonstrado em suínos, após intensas lavagens das células espermáticas (MOORE & HIBBITT, 1976).

A composição protéica do plasma seminal é afetada por determinadas condições, como o intervalo entre as ejaculações, o método de colheita do sêmen, a estação do ano, a idade e raça dos animais (HAFEZ, 1987; MIES FILHO, 1987; KILLIAN et al., 1996).

---

A concentração maior de proteínas no plasma seminal de garanhões, conferiu proteção mais eficiente às células espermáticas quando submetidas a diferentes tratamentos térmicos (VIANNA et al., 2002).

O cloreto tem sido descrito como um componente desestabilizador da estrutura terciária das proteínas, impedindo a ligação dessas à membrana dos espermatozoides de bovinos, tornando-os vulneráveis às agressões de diferentes origens (PANGAWKAR et al., 1988).

Num estudo realizado por YUMURA et al. (2002) foi verificado que altas concentrações (135 Mm) de íons  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$  provocou efeitos deletérios na motilidade espermática, após a preservação de espermatozoide humano em solução livre de eletrólitos.

O magnésio provavelmente está envolvido no transporte espermático (OMU et al., 2001). Em humanos, a infertilidade tem sido associada a níveis anormais de cálcio e magnésio (PANDY et al., 1983). Contrariamente, OMU et al. (2001) não verificaram diferentes níveis de magnésio em homens com parâmetros seminais normais e homens oligoastenozoospermicos. Similarmente, SORENSEN et al. (1999) não verificaram correlação entre os níveis de magnésio e a fertilidade em homens.

O cálcio é um íon importante na fisiologia espermática, incluindo a motilidade, metabolismo, a reação do acrossoma e fertilização (YANAGIMACHI, 1981).

Nos cães, o fluído prostático ou componentes do plasma seminal possuem efeitos deletérios sobre as células submetidas a baixas temperaturas, refletida pela diminuição acentuada da motilidade espermática,

embora não se conheça a natureza das interações envolvidas (CONCANNON & BATTISTA, 1989). Esses efeitos podem ser comprovados pela maior motilidade espermática pós criopreservação, quando o plasma é retirado pela centrifugação antes do procedimento (ENGLAND & ALLEN, 1992).

No que diz respeito ao efeito da sazonalidade sobre os componentes do plasma seminal, poucos estudos têm sido realizados.

BORQUE & SAGÜES (1992), no hemisfério norte, encontraram uma sutil variação estacional na concentração de proteínas presentes no plasma seminal de carneiros, com maiores concentrações situadas nos meses de fevereiro, maio e outubro.

Num outro estudo realizado em ovinos, por GUNDOGAN & ELITOK (2004) foram detectados valores mais altos de proteínas no plasma seminal no período de outono, início da estação reprodutiva.

Em macacos (*Presbytis entellus entellus*), em estudo realizado no hemisfério norte, não foi observado sazonalidade nos níveis de magnésio do plasma seminal (LOHIYA et al., 1998).

### **3.2.6. PERFIL ELETROFORÉTICO DO PLASMA SEMINAL**

O plasma seminal é um meio de transporte e sustentação dos espermatozoides, sendo constituído no cão por secreções testiculares, epididimais e prostática.

O mapeamento e a identificação de componentes protéicos solúveis no ejaculado, pela eletroforese, vêm sendo realizados desde a década de 50, buscando marcadores de fertilidade nos machos (BERTOK & PASZTOR, 1957).

---

BAAS et al. (1983) pesquisando fatores no plasma seminal que afetavam a motilidade e viabilidade dos espermatozoides de touros, demonstraram que o efeito deletério observado foi restrito à fração que continha proteínas de alto peso molecular do plasma seminal.

Vários estudos foram conduzidos, até que KILLIAN et al. (1993) desenvolveram uma equação matemática para diferenciar a fertilidade de touros de acordo com o perfil protéico encontrado na eletroforese de plasma seminal. Essa equação foi baseada em 4 proteínas, duas (55kDa pI 4,8 e 26kDa pI 6,4) freqüentes em touros de alta fertilidade e duas (16kDa pI 4,1 e 6,7) em touros de baixa fertilidade.

BRANDON et al. (1999) identificaram no plasma seminal de eqüinos uma proteína de 72kDa que apresentou correlação positiva com a fertilidade, e também detectaram três proteínas de pesos moleculares de 75kDa, 18kDa e 16kDa, que se correlacionaram negativamente com a fertilidade.

Na espécie canina, poucos foram os estudos realizados no plasma seminal. Os primeiros são datados da década de setenta (DUBIEL, 1975; BRUSCHI et al., 1979) e foram realizados com a técnica de eletroforese sob condições não desnaturantes, sendo identificadas somente três frações protéicas.

Estudos realizados por SOUZA & LOPES (2002) utilizando gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) identificaram em cães com fertilidade desconhecida, 25 bandas com pesos moleculares entre 136kDa e 3,5kDa. Posteriormente, SOUZA (2003) verificou um total de 37

---

bandas e identificou uma correlação positiva entre a densitometria de duas bandas protéicas, 67kDa e 58,6kDa, do plasma seminal e a fertilidade *in vitro*.

Num estudo realizado com fluído epididimal utilizando a SDS-PAGE, foram identificadas 27 bandas protéicas de pesos moleculares variando de 245kDa a 10,3kDa (MARTINS et al., 2002).

Tem sido estudada a influência das proteínas do plasma seminal de bovinos na congelabilidade do sêmen. RONCOLLETA (1999) identificou, em touros de alta congelabilidade, a predominância da proteína de 61,8kDa no plasma seminal e a ausência dessa proteína em touros de baixa congelabilidade. Resultados semelhantes aos de RONCOLLETA (1999) foram encontrados por JOBIM et al. (2002).

Em outro estudo PÉREZ-PÉ et al. (2001) compararam o padrão eletroforético (SDS-PAGE) do plasma seminal na estação reprodutiva e não reprodutiva, e verificaram que cinco bandas (20kDa, 21kDa, 24kDa, 36kDa e 67kDa) presentes no plasma seminal da estação reprodutiva diminuíram nas amostras no inverno e primavera e somente traços dessas proteínas foram identificados no plasma seminal colhido no verão.

Estudos do perfil protéico do plasma seminal de cães relacionados com congelabilidade e sazonalidade não foram encontrados na literatura científica.



## *MATERIAL E MÉTODOS*

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO**

As colheitas de sangue, dos ejaculados, análises seminais e a congelação do sêmen foram executadas no Canil Von Springer, no município de Avaré (**latitude 23° 35' S e longitude 48° 59' W**), às margens da represa de Jurumirim, no estado de São Paulo, no período de julho de 2002 a agosto de 2003.

A descongelação de sêmen, as análises pós-descongelação, dosagens bioquímicas de proteína total, cloretos totais e magnésio no plasma seminal, e as dosagens séricas de testosterona foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ, UNESP, Botucatu.

A determinação das concentrações de sódio, potássio e cálcio no plasma seminal foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel", da FCAV, UNESP, Jaboticabal.

As análises computadorizadas dos géis de eletroforese foram realizadas no Departamento de Física e Biofísica, IB, UNESP, Botucatu.

### **4.2. DADOS CLIMATOLÓGICOS**

Os dados referentes às variações de temperatura ambiente (°C), índice pluviométricos (mm<sup>3</sup>) foram obtidos na página eletrônica do CIIAGRO do

---

Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo ([www.iac.org.sp](http://www.iac.org.sp)). Para a obtenção dos dados foi considerada a localização do canil.

### **4.3. ANIMAIS**

Foram utilizados oito (8) cães adultos, reprodutores, com idade entre 1ano e 2meses e 6 anos, pesando entre 12 e 35 Kg, de três raças diferentes **(4 animais da raça Springer Spaniel, 2 da raça Blood Hound e 2 da raça Golden Retriever)**, em atividade reprodutiva, com sorologia negativa para leptospirose e brucelose canina.

Os cães foram submetidos ao mesmo manejo durante todo o experimento, mantidos em duplas em canis com solário e a cada semana dois deles ficavam soltos num grande piquete com grama, e com acesso à represa. Receberam ração comercial de boa qualidade, duas vezes ao dia e água *ad libitum*.

Antes de iniciar o experimento foi realizada uma colheita de sêmen e sangue nos animais disponíveis ao estudo. Entretanto, como esses animais estavam acostumados à manipulação, não houve necessidade de um período de adaptação às colheitas.

Quinzenalmente, os animais foram examinados clinicamente e submetidos à colheita de sangue e ejaculados. Antes da colheita de sêmen, foram avaliadas a consistência e mobilidade testicular na bolsa escrotal.

#### 4.4. DOSAGENS HORMONAIS

As amostras de sangue foram obtidas a cada 15 dias, sempre no período da manhã (**entre 8:30 e 11:30 horas**), na mesma seqüência e imediatamente após a colheita de sêmen, pela punção da veia jugular nos animais de menor porte e pela veia cefálica nos animais de porte racial maior. Foram usadas agulhas de calibre 27x8 mm, acopladas a frascos "Vacuntainer", e colhido sangue numa quantidade aproximada de 10,0 mL. Após a colheita as amostras foram centrifugadas a 1500 g por 10 minutos, e o plasma sanguíneo foi aliqüotado, acondicionado em frascos plásticos de 1,5 mL e congelado a -20°C até o momento das análises.

As concentrações séricas de testosterona foram determinadas por radioimunoensaio (RIA) em fase sólida utilizando-se "kits" comerciais (**Coat – A-Count Total Testosterone, DPC<sup>®</sup>, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, EUA**).

O radioimunoensaio em fase sólida é baseado em anticorpos específicos contra a testosterona imobilizados nas paredes dos tubos de polipropileno. A testosterona marcada com  $^{125}\text{I}$  compete por um período fixo de tempo com a testosterona da amostra para os sítios dos anticorpos. Para a realização do teste foram adicionados 50,0  $\mu\text{L}$  da amostra em 1,0 mL de testosterona total conjugada ao  $^{125}\text{I}$ , que após homogeneização foi incubada por 30 minutos a 37°C. Em seguida o tubo foi decantado, para separar a forma ligada da livre. Posteriormente, os tubos foram levados a um contador gamma (**Cobra<sup>TM</sup>II Auto-Gamma, Packard, Brasil**) para a determinação da radiação que é proporcional à quantidade de antígeno  $^{125}\text{I}$  ligado ao anticorpo. A quantidade

de testosterona presente na amostra foi determinada a partir de uma curva de calibração que acompanha o "kit" comercial. As análises foram realizadas em duplicata, e a concentração de testosterona foi expressa em ng/dL. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 17%. Não teve variação inter-ensaio, pois foi utilizada uma única curva de calibração e, as dosagens foram realizadas em um teste único.

#### 4.5. COLHEITA DE SÊMEN

A colheita do sêmen foi realizada pelo método de estimulação digital (método da mão enluvada), utilizando fêmeas em "cio" como manequim.

Os ejaculados foram colhidos em tubos graduados de plástico de 15 mL, acoplados a funis plásticos ou numa mucosa plástica, previamente aquecidos a 37°C (Figura 1). A primeira fração (pré espermática) foi desprezada, a segunda (espermática) e parte da terceira (prostática) foram colhidas juntamente.

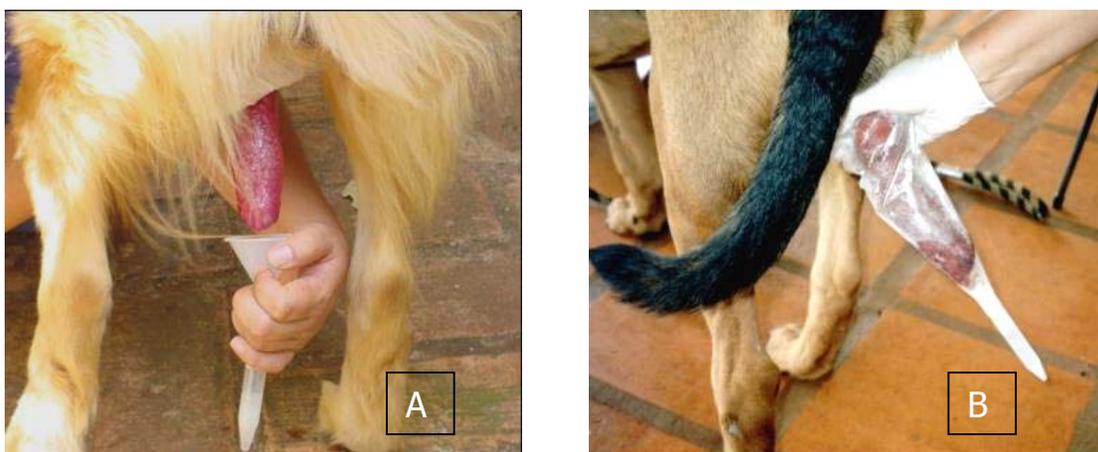


Figura 1. Colheita de sêmen pelo método de estimulação digital. Funil de plástico (A) ou mucosa plástica (B) acoplada a um tubo de plástico calibrado.

---

## **4.6. ANÁLISE DOS EJACULADOS**

Imediatamente após a colheita, o ejaculado foi mantido em temperatura ambiente, analisado macro e microscopicamente, centrifugado, e então, o plasma seminal foi separado. O "pellet" foi submetido à criopreservação.

### **4.6.1. Análises macroscópicas**

#### 4.6.1.1. Volume

Mensurado pela leitura direta da graduação do tubo coletor.

#### 4.6.1.2. pH

Uma gota de sêmen foi colocada em fita para avaliação de pH. Após 30 segundos, a cor correspondente à zona impregnada uniforme foi comparada com a tira de calibração das fitas colorimétricas com variação de 4,0 a 7,0 e de 6,5 a 10 (**Merck HGaA, Alemanha**).

### **4.6.2. Análises microscópicas**

#### 4.6.2.1. Motilidade espermática

Uma gota de sêmen fresco foi colocada entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37°C, e observada em microscópio de contraste de fase (**Zeiss, Alemanha**) com aumento de 10X. A porcentagem de células com movimentos progressivos, variou de 0 (todas as células imóveis) a 100 (todas as células em movimento).

#### 4.6.2.2. Vigor

O mesmo procedimento de análise da motilidade foi utilizado, sendo avaliada a qualidade de movimento progressivo dos espermatozoides, pelo escore de 0 (nenhum movimento) a 5 (movimento retilíneo).

#### 4.6.2.3. Concentração espermática

Para a determinação da concentração (número de spz/mL) foi utilizada uma diluição de 1:20, sendo 50µL do ejaculado, em 950µL de água destilada. A solução foi utilizada para preencher a câmara hematocimétrica de "Neubauer". Após a sedimentação das células espermáticas, a leitura foi realizada em microscópio de contraste de fase, com aumento de 40X, e o número de células contadas foi expresso em espermatozoides por mL.

#### 4.6.2.4. Morfologia espermática

Depois de confeccionados os esfregaços de sêmen em lâmina de vidro, foram fixados em formol salina durante 10 minutos em banho-Maria, a 37°C, secos em temperatura ambiente, e armazenados. Posteriormente, as lâminas foram coradas pelo método de KARRAS modificado por PAPA et al. (1988). Realizou-se a contagem diferencial de 100 células em microscópio de contraste de fase (**Zeiss, Alemanha**), com objetiva de imersão (100X). As alterações morfológicas foram classificadas em defeitos maiores e menores, segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998).

#### 4.7. CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

Após as análises macro e microscópicas, o ejaculado foi centrifugado a 800 g por 10 minutos (**Excelsa Baby II, Fanem, modelo 206-R, Brasil**).

O "pellet" obtido foi ressuspenso em meio diluidor utilizado por PEÑA & LINDE-FORSBERG (2000) e modificado (**Tris 2,4 g/ ácido cítrico 1,4 g/ glicose 0,8 g/ gema de ovo 20%/ glicerol 7%/ OEP 1%/ amicacina 0,02%**), com uma concentração final de  $80 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Realizada a diluição, o sêmen foi envasado em palheta de 0,5 mL, lacrada com álcool polivinílico e levada a um refrigerador, com temperatura constante de 5°C (**MINITUB<sup>®</sup>, Brasil**), por um período de uma hora.

A congelação das palhetas foi realizada em vapor de nitrogênio, em uma grade de metal, posicionada a 6,0 cm da coluna de nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido, numa caixa de isopor de 38x15x24, durante 20 minutos. Após esse período, as palhetas foram mergulhadas no N<sub>2</sub> líquido e, posteriormente, armazenadas em botijão criogênico.

A descongelação das palhetas foi realizada em banho-Maria (**EV:015, Evlab, Brasil**) a 72°C por 8 segundos. Imediatamente após a descongelação, o sêmen da palheta foi diluído em 0,5 mL do meio utilizado (**TRIS - ácido cítrico - OEP modificado, sem glicerol**). O sêmen, acondicionado em tubos plásticos de 1,5 mL, foi mantido em bloco térmico (**Kacil, Brasil**) a 37°C durante as análises pós-descongelação.

#### 4.7.1. Avaliações microscópicas pós-descongelção

##### 4.7.1.1. Motilidade e vigor espermático.

As avaliações de motilidade e vigor foram realizadas quatro minutos após a descongelção, seguindo o mesmo método utilizado para o sêmen a fresco.

##### 4.7.1.2. Integridade de membrana espermática

Para a avaliação da integridade das membranas dos espermatozoides foi utilizada a sonda fluorescente, técnica descrita por HARRISON & VICKERS (1990), e modificada para cães por CUNHA et al (1996) utilizando-se as soluções estoques de iodeto de propídeo (10 mg de iodeto de propídeo em 20 mL de solução fisiológica), diacetato de 6-carboxifluoresceína (**9,2 mg de diacetato de 6-carboxifluoresceína em 20 mL de dimetilsulfóxido – DMSO**), formaldeído (**formalina a 40% diluída em 1:80 de solução fisiológica**), e citrato de sódio a 3% (**3,0 g de citrato de sódio em 100 mL de solução fisiológica**). Uma alíquota de 5 µL de sêmen foi adicionada a 40 µL da solução de coloração (**10 µL da solução de carboxifluoresceína, 5 µL da solução de iodeto, 5 µL da solução de formaldeído e 480 µL de citrato a 3%**) preparada no máximo 24 horas antes do uso. O material foi analisado entre lâmina e lamínula em microscópio de epifluorescência (**Olympus, BX60, USA**) com objetiva de 40x. Foram contadas 100 células classificando-as como: células com membranas íntegras, aquelas emitindo fluorescência verde e células com membranas lesadas, aquelas emitindo fluorescência vermelha ou verde e vermelha.

#### **4.8. MENSURAÇÃO TESTICULAR E PROSTÁTICA**

A cada 15 dias, aproximadamente quatro horas após a colheita de sêmen, os cães foram submetidos ao exame ultra-sonográfico da próstata e testículos.

##### **4.8.1. Ultra-sonografia prostática**

Mantendo os cães em decúbito lateral, fixando um dos membros pélvicos abduzido, realizou-se a ultra-sonografia por via trans-abdominal, utilizando um transdutor setorial de 7,5 MHz (**Scanner 240, PieMedical, Brasil**), a fim de obter, de cada animal, imagens longitudinais. Por essas imagens foi possível avaliar a homogeneidade do parênquima e mensuração do comprimento, altura e elipse da próstata (Figura 2). O volume prostático foi obtido baseado na elipse em  $\text{mm}^3$ . Para facilitar o exame foi realizada a palpação retal, com a fixação digital do órgão.

##### **4.8.2. Ultra-sonografia testicular**

A mensuração testicular foi realizada com o auxílio do mesmo equipamento de ultra-sonografia. Mantendo o animal em decúbito lateral, avaliou-se a homogeneidade do parênquima, a altura, comprimento e elipse de ambos os testículos (Figura 3). O volume testicular foi baseado na medida elíptica em  $\text{mm}^3$ . Após a obtenção do volume de cada testículo foi realizada a soma desses dados, resultando no volume testicular combinado.

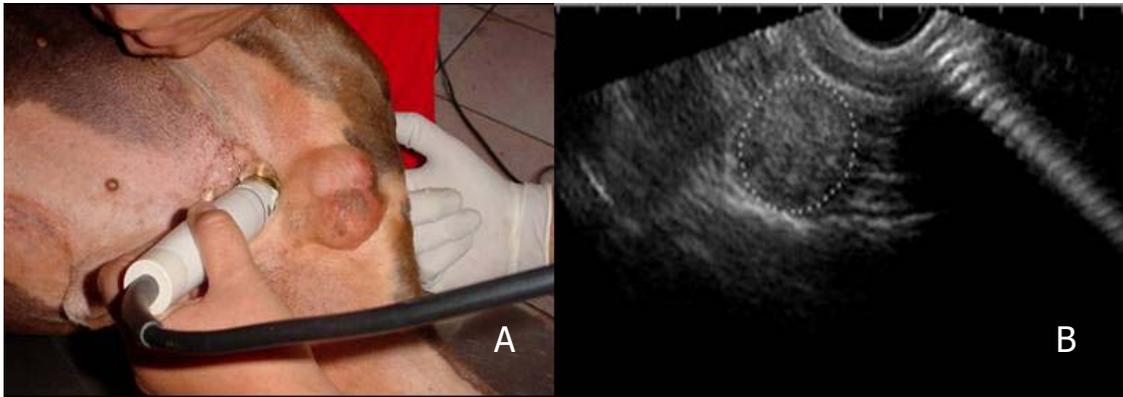


Figura 2. Realização do exame de ultra-som e palpção retal da próstata (A). Imagem longitudinal prostática (B).

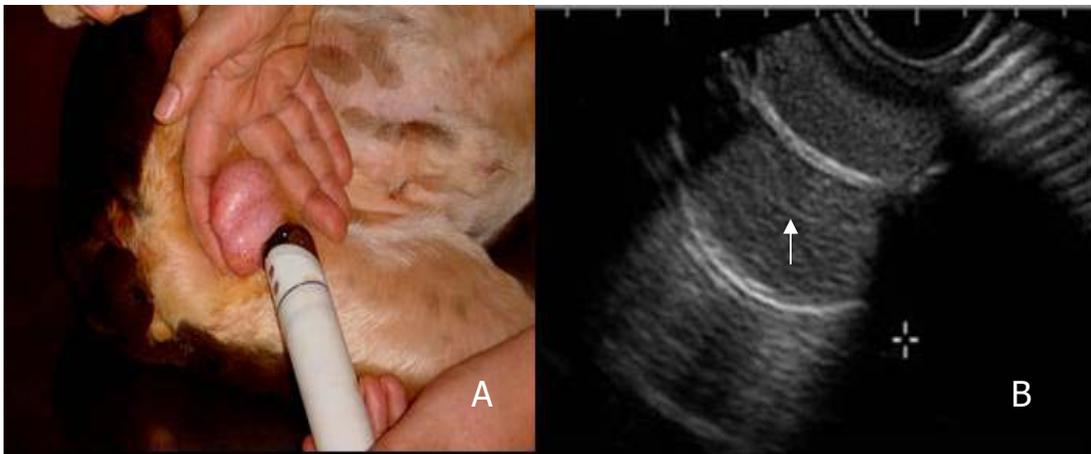


Figura 3. Avaliação testicular pelo exame de ultra-som (A). Imagem longitudinal do parênquima testicular (B). A ponta da seta evidencia a rafe testicular.

#### 4.9. ANÁLISE BIOQUÍMICA DO PLASMA SEMINAL

Ainda no canil, o ejaculado foi centrifugado a 800 g por 10 minutos e o sobrenadante (plasma seminal) armazenado em frascos plásticos de 10 mL e

congelado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após 12 a 24 horas as amostras foram submetidas a uma segunda centrifugação a 4200 g por uma hora a  $4^{\circ}\text{C}$  em centrífuga refrigerada (**MLW, modelo K-23, Alemanha**), para a retirada de células espermáticas restantes. O sobrenadante resultante foi aliqüotado em tubos plásticos de 1,5 mL e armazenados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises bioquímicas e da separação eletroforética das proteínas.

#### **4.9.1. Dosagens bioquímicas**

Para a determinação das concentrações de cloretos, proteína total, e magnésio no plasma seminal foram utilizados “kits” comerciais de diagnóstico. As concentrações de sódio, potássio e cálcio foram determinadas por um analisador de íons seletivos.

##### **4.9.1.1. Proteínas Totais**

As concentrações de proteínas totais do plasma seminal foram determinadas pelo método colorimétrico com o reagente de Biureto (**Labtest Diagnóstica, Brasil**). O teste se baseia no princípio de que os íons de cobre em meio alcalino (**reagente de biureto**) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando uma cor púrpura, que tem absorvância máxima de 545 nm, proporcional à concentração das proteínas na amostra. Para a realização das dosagens foram diluídos 20  $\mu\text{L}$  da amostra em 1,0 mL da solução trabalho do reagente de biureto (**hidróxido de sódio 1,86 mol/L, tartarato de sódio e potássio 320 mmol/L, sulfato de cobre 120 mmol/L e iodeto de potássio 300 mmol/L em 450 mL de água**

**MilliQ**). Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, após a calibração com o tubo branco (**20 µL de água MilliQ em 1,0 mL da solução de uso do biureto**) foram realizadas as leituras, todas em duplicata, em espectrofotômetro colorimétrico (**B582, Micronal, Brasil**), num comprimento de onda de 545 nm. Os cálculos foram baseados nos resultados das leituras do padrão de proteínas totais do "kit" utilizado (**20 µL do padrão em 1,0 mL da solução de uso do biureto**). Os valores foram expressos em ng/dL.

#### 4.9.1.2. Cloretos Totais

As concentrações de cloretos totais do plasma seminal foram determinadas pelo método colorimétrico com o reagente de cor (**Labtest Diagnóstica, Brasil**). O princípio do teste é que os íons cloretos presentes na amostra reagem com tiocianato de mercúrio, formando cloreto de mercúrio e íons tiocianato. Os íons tiocianato quando combinados com íons férrico formam tiocianato férrico, de coloração amarela com intensidade proporcional à concentração de cloretos. Para a realização das dosagens foram diluídos 10 µL da amostra em 3,5 mL da solução do reagente de cor (**tiocianato de mercúrio 2 mmol/L, nitrato férrico 17 mmol/L e ácido nítrico 30 mmol/L**) e adicionados 100 µL de ativador do teste (**nitrato de mercúrio 1,1 mmol/L e ácido nítrico 0,9 mmol/L**). As amostras foram incubadas por dois minutos em temperatura ambiente antes de serem realizadas as leituras, todas em duplicata, em espectrofotômetro (**B582, Micronal, Brasil**), utilizando um comprimento de onda de 470 nm. A

---

calibração foi feita com o tubo branco **(100 µL da solução ativadora em 3,5 mL do reagente de cor)** e os cálculos baseados nos resultados das leituras do padrão de cloretos totais **(10 µL do padrão, 100 µL da solução ativadora em 3,5 mL do reagente de cor)**. Os valores foram expressos em mEq/L.

#### 4.9.1.3. Magnésio

As concentrações de magnésio do plasma seminal foram determinadas pelo método colorimétrico **(Labtest Diagnóstica, Brasil)**. Os íons magnésio reagem com o magon sulfonado (cor azul) em meio alcalino, formando um complexo de cor rósea que é proporcional à quantidade de íons magnésio na amostra. Para a realização do teste foram diluídos 10 µL da amostra em 1,0 mL da solução do reagente de uso **(tris hidroximetil-amino metano 400 mmol/L, carbonato de potássio 153 mmol/L, pH 11,5 diluído em partes iguais com magon sulfonado 0,1 g/L)**. Após a incubação por dois minutos, em temperatura ambiente realizou-se as leituras, todas em duplicata, em espectrofotômetro **(B582, Micronal, Brasil)**, utilizando um comprimento de onda de 505 nm. A calibração foi feita com o tubo branco **(1,0 mL do reagente de uso)** e os cálculos baseados nos resultados das leituras do padrão de cloretos totais **(10 µL do padrão, 1,0 mL do reagente de cor)**. Os valores foram expressos em mg/L.

#### 4.9.1.4. Sódio, Potássio e Cálcio

As concentrações de sódio, potássio e cálcio foram determinadas utilizando um analisador de íons seletivos (**ISELAB – Drake Eletrônica e Comércio Ltda**). O princípio físico do teste é a medição de um íon determinado (Na, K e Ca) através de um eletrodo de referência e um outro de medição sensível a este íon, conectados através de um sistema eletrônico (amplificador) e imersos na amostra cuja concentração iônica se deseja determinar. O eletrodo de íon seletivo não mede diretamente a concentração, mas sim a atividade do íon considerado (Na, K e Ca). A concentração é calculada com base na atividade iônica. Para a realização do teste, o aparelho foi calibrado com a solução Cal II (**110 mmol/L de Na<sup>+</sup>, 8 mmol/L de K<sup>+</sup>, 3 mmol/L de Ca<sup>++</sup>, 2,5 mmol/L de Li<sup>+</sup>, agente fungicida e água deionizada**). Uma amostra de 50 µL foi aspirada para a determinação dos íons. A cada dez leituras, o aparelho realizava, automaticamente, uma limpeza com a solução Cal I (**150 mmol/L de Na<sup>+</sup>, 4 mmol/L de K<sup>+</sup>, 1,25 mmol/L de Ca<sup>++</sup>, 1,0 mmol/L de Li<sup>+</sup>, agente fungicida e água deionizada**).

#### 4.9.2. Técnica de eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A eletroforese do plasma seminal foi realizada segundo SOUZA (2003), em cuba vertical para corrida eletroforética (**Hoefer MiniVE Vertical Electrophoresis System – Amersham Biosciences**), utilizando-se gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS – PAGE), conforme descrito a seguir:

---

Utilizou-se duas concentrações de poliacrilamida de 12% e 18% para a verificação das frações protéicas de alta e baixa massa molecular, respectivamente. Foram utilizadas duas concentrações de proteína total sendo uma de 3 µg/µL e outra de 5 µg/µL, para as diferentes frações.

As amostras previamente diluídas em água, numa concentração final de 3µg/µL (para o gel de 18%) e 5 µg/µL (para o gel de 12%) de proteína total foram adicionadas ao tampão da amostra **(TRIS-HCl 60mM, pH 6,8, glicerol 50%, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 23mM, 0,1% bromofenol azul em água MilliQ)** na proporção de 1:4, homogeneizadas no agitador de tubos **(Multimixer, Biomixer, modelo MVS-1, Brasil)**, e armazenadas a freezer a -20°C por 24 horas.

Após a limpeza com álcool 70%, as placas de vidro foram montadas sobre o suporte da cuba de eletroforese e colocados os géis de separação, 12% e 18%, com auxílio de uma pipeta de 1,0 mL. Sobre o gel, para proporcionar uma superfície mais homogênea foi colocada água MilliQ.

Durante o período de polimerização do gel, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente **(aproximadamente 15 a 20°C)**, homogeneizadas e fervidas a 95° C durante 7 minutos.

Após a polimerização do gel de separação, os suportes com os géis foram virados para a retirada da água, e com um papel filtro foi concluída a secagem. Um molde de polietileno em forma de pente foi acomodado sobre o gel de empilhamento, de modo a formar canaletas para permitir a aplicação das amostras.

O gel de empilhamento a 5% foi preparado e aplicado sobre o gel de separação polimerizado. Após a polimerização do referido gel, o molde foi retirado e os suportes, contendo as placas, colocados na cuba de corrida de eletroforese, onde foi adicionado o tampão de corrida (**TRIS 25 Mm, glicina 192 Mm, SDS 0,1% em água MilliQ**) diluído na proporção de 1 de tampão para 4 de água.

As amostras foram aplicadas nas canaletas dos géis, e em uma delas foi aplicado um padrão de peso molecular "Full Range Rainbow Recombinant Protein Molecular Weight Markers" (**10 a 250 kDa, Amersham Bioscience**), para proteínas de alto peso molecular e "Rainbow Coloured Protein Molecular Weight Markers" (**2,5 a 45 kDa, Amersham Bioscience**), para as de baixo peso molecular, nos géis de separação a 12 e 18%, respectivamente.

A cuba foi ligada a uma fonte elétrica bipolar (**EPS 300 Power Supply, Amersham Biosciences**) com uma corrente elétrica constante de 25 mA e voltagem máxima de 300 V, num período máximo de 4 horas.

Após a corrida eletroforética, os géis foram retirados das placas de vidro, colocados em uma vasilha plástica e corados com *Coomassie* azul brilhante R-250 (**1,0 g de *Coomassie* azul brilhante R-250, 450 mL de metanol, 100 mL de água MilliQ e 450 mL de ácido acético glacial**), aquecido por 20 segundos em forno de microondas (**CCE, Brasil**), em potência máxima e mantidos sob constante agitação (**Rotary Shaker, Biomixer, modelo MOS-1, Brasil**) por 30 minutos e uma hora para os géis de separação a 18 e 12%, respectivamente.

Os géis foram descorados em uma solução (**100 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial e 800 mL de água MilliQ**) aquecida (20 segundos em forno de microondas, em potência máxima), sob constante agitação durante 15 minutos, esse procedimento foi realizado duas vezes. Novas descolorações foram realizadas em água MilliQ por 20 minutos em microondas em potência 70W, e por 10 minutos em potência máxima. Os géis foram armazenados em vasilhas plásticas com água MilliQ em geladeira, a 4°C.

As imagens dos géis foram digitalizadas (**VDS, Amersham Biosciences**) e o peso molecular e a densidade óptica integrada (IOD), para cada banda, em cada um dos géis foram determinados por um "software" analisador de imagens (**Image Master 3, Amersham Biosciences**).

#### 4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Das variáveis estudadas foram obtidas médias mensais, que foram dispostas em cinco (5) blocos, correspondentes às estações climáticas, do período de julho de 2002 a agosto de 2003. Conforme quadro abaixo:

<b>Inverno</b>	<b>Primavera</b>	<b>Verão</b>	<b>Outono</b>	<b>Inverno</b>
<b>2002</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2003</b>	<b>2003</b>
Julho	Outubro	Janeiro	Abril	Julho
Agosto	Novembro	Fevereiro	Maio	Agosto
Setembro	dezembro	Março	Junho	

---

Para o cálculos das médias mensais foi utilizado o programa Excel da Microsoft para Windows XP (2001).

As médias mensais foram divididas em 5 (cinco) blocos, conforme dispostos anteriormente. Posteriormente, calculou-se as médias das estações climáticas e os resultados dispostos em tabelas. Desta maneira, podem ser identificadas as diferenças e semelhanças dos resultados em função do efeito sazonalidade. Todas as médias são apresentadas  $\pm$  desvio padrão da média.

Foi efetuada a análise de variância (ANOVA) para modelos lineares de efeito para os dados homogêneos. O nível de probabilidade de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. A avaliação das correlações entre as variáveis hormonais, características seminais, dosagens bioquímicas e as variáveis ambientais foram realizadas pelas correlações de Pearson, para isso foi utilizada a versão 7.0 do programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC).

As relações entre as variáveis seminais e bioquímicas foram investigadas pela análise de correlação canônica utilizando-se a mesma versão do programa SAS.



## *RESULTADOS*

## 5. RESULTADOS

### 5.1. VARIAÇÕES CLIMÁTICAS

Durante o período do experimento, a temperatura variou de 10,2°C a 32,8°C, e o índice pluviométrico de 33 mm<sup>3</sup> a 476 mm<sup>3</sup>, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Variações climáticas\* (média ± desvio padrão, valores mínimos/máximos), segundo as estações, no período de 14 meses, no município de Avaré, SP.

	<b>Inverno</b>	<b>Primavera</b>	<b>Verão</b>	<b>Outono</b>	<b>Inverno</b>
	<b>2002</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2003</b>	<b>2003</b>
<b>Temperatura</b>	25,4 ± 2,9	29,6 ± 0,8	31,1 ± 1,7	25,6 ± 2,1	23,5 ± 0,3
<b>Máxima (°C)</b>	(22 / 26,9)	(29 / 30,5)	(29,4 / 32,8)	(24,2 / 28)	(23,3 / 23,7)
<b>Temperatura</b>	12,3 ± 2,4	18,3 ± 0,3	20,1 ± 1,2	14,6 ± 1,9	12,8 ± 0,0
<b>Mínima (°C)</b>	(10,2 / 14,4)	(17,9 / 18,9)	(19,3 / 20,7)	(12,4 / 16,5)	(12,8 / 12,8)
<b>Precipitação</b>	89,7 ± 25,2	184,7 ± 83,7	321,0 ± 145,6	91,7 ± 43,7	64,0 ± 43,8
<b>(mm<sup>3</sup>)</b>	(63 / 113)	(93 / 257)	(187 / 476)	(63 / 142)	(33 / 95)

\* Informações obtidas no site do CIIAGRO do IAC de Campinas.

## 5.2. VARIAÇÕES HORMONAIS

Os resultados dos valores médios das concentrações séricas de testosterona em cada estação do ano, estão sumarizados na Tabela 2.

Os resultados das concentrações de testosterona correspondem a apenas sete (7) animais. O animal número 2, da raça Blood Hound, apresentou uma variação nas concentrações de testosterona muito díspare em relação aos outros animais, modificando o padrão médio dos animais considerados e foi, portanto, excluído das análises estatísticas.

Tabela 2 – Concentrações séricas médias de testosterona (média  $\pm$  desvio padrão), de amostras colhidas a cada 15 dias, durante 14 meses, de sete cães reprodutores, nas diferentes estações climáticas, no município de Avaré, SP.

	<b>Inverno</b>	<b>Primavera</b>	<b>Verão</b>	<b>Outono</b>	<b>Inverno</b>
	<b>2002</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2003</b>	<b>2003</b>
<b>Testosterona (ng/mL)</b>	1,81 $\pm$ 0,96	1,93 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	1,31 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>	2,02 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	1,93 $\pm$ 1,23

Letras diferentes apresentam diferenças significativas para  $p < 0,05$ .

Foi evidenciada uma queda significativa nas concentrações de testosterona durante o verão 2003. Houve diferença significativa entre os períodos de primavera 2002 e verão 2003 ( $p < 0,05$ ) e entre o verão e o outono de 2003, para  $p = 0,016$ .

As variações das concentrações médias de testosterona sérica em relação às condições climáticas encontram-se nas Figuras 4 e 5.

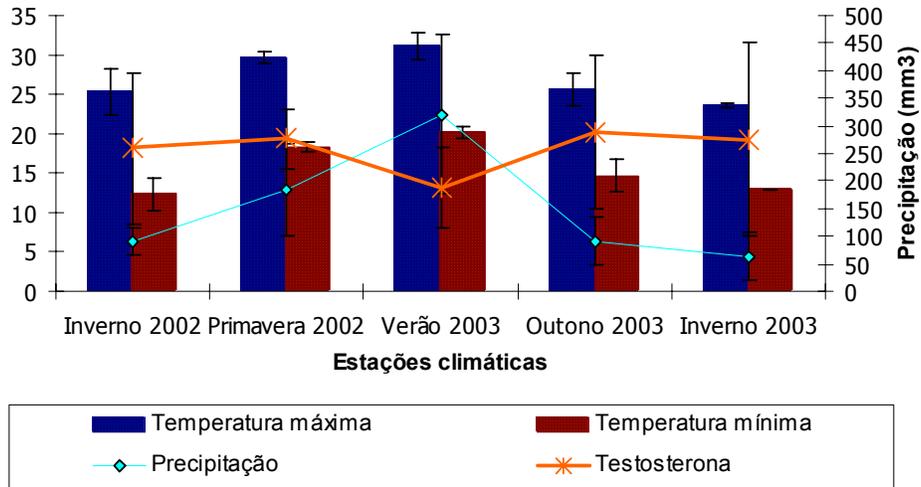


Figura 4. Concentração média  $\pm$  desvio padrão de testosterona (ng/mL) de sete cães, temperaturas máximas e mínimas ( $^{\circ}$ C) e a precipitação (mm<sup>3</sup>) durante 14 meses, divididos em estações climáticas.

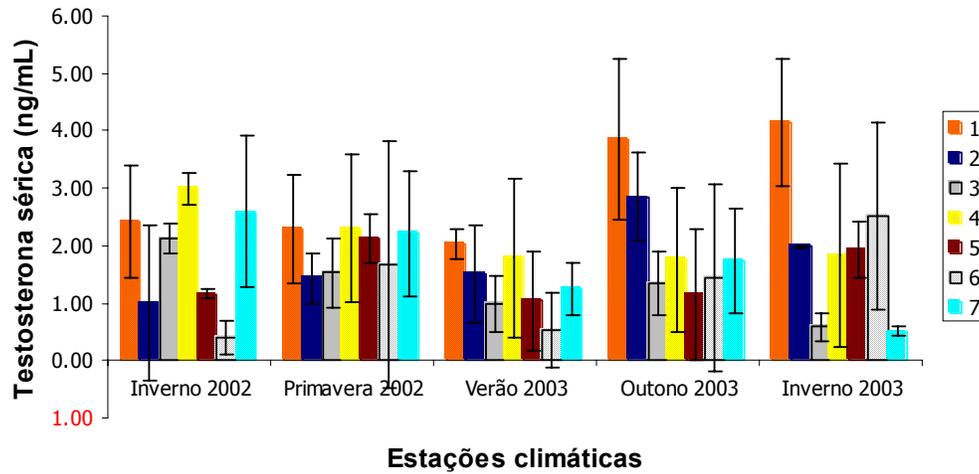


Figura 5. Perfil de concentração média  $\pm$  desvio padrão de testosterona (ng/mL) de cada um dos sete cães, ao longo de 14 meses, divididos em estações climáticas.

### 5.3. VARIAÇÕES ESPERMÁTICAS

#### 5.3.1. Sêmen a fresco

As médias, por estação do ano, dos resultados dos ejaculados de oito (8) cães estão apresentados na Tabela 3.

Foi observada uma diferença significativa na variável motilidade espermática entre o período de primavera 2002 e verão 2003 ( $p= 0,004$ ).

Para as demais variáveis não foi evidenciada diferença estatística.

Tabela 3 – Características espermáticas (média  $\pm$  desvio padrão; valores mínimos/máximos) de oito cães reprodutores por estação, durante 14 meses, nas diferentes estações climáticas, no município de Avaré, SP.

	<b>Inverno</b>	<b>Primavera</b>	<b>Verão</b>	<b>Outono</b>	<b>Inverno</b>
	<b>2002</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2003</b>	<b>2003</b>
<b>Volume</b>	6,93 $\pm$ 3,50	8,16 $\pm$ 4,76	7,59 $\pm$ 3,43	7,53 $\pm$ 2,48	8,19 $\pm$ 1,66
<b>(mL)</b>	(4,2 / 12,4)	(4,3 / 16,2)	(4,0 / 14,7)	(4,0 / 11,6)	(5,9 / 10,2)
<b>pH</b>	6,41 $\pm$ 0,30	6,21 $\pm$ 0,30	6,27 $\pm$ 0,25	6,09 $\pm$ 0,24	6,20 $\pm$ 0,33
	(6,0 / 6,9)	(5,8 / 6,7)	(5,9 / 6,6)	(5,7 / 6,5)	(5,8 / 6,8)
<b>Motilidade</b>	84,00 $\pm$ 3,22	84,17 $\pm$ 4,78	89,56 $\pm$ 1,69	87,97 $\pm$ 3,30	88,75 $\pm$ 3,18
<b>(%)</b>	(77,5 / 89,0)	(77,5 / 91,7)	(87,5 / 91,7)	(81,7 / 91,7)	(81,7 / 91,7)
<b>Vigor</b>	4,21 $\pm$ 0,35	4,09 $\pm$ 0,52	4,35 $\pm$ 0,30	4,53 $\pm$ 0,33	4,59 $\pm$ 0,28
<b>(0 – 5)</b>	(3,7 / 4,7)	(3,3 / 4,8)	(3,9 / 4,8)	(4,2 / 5,0)	(4,2 / 5,0)
<b>Concentração</b>	67,98 $\pm$ 60,61	59,84 $\pm$ 38,89	73,81 $\pm$ 29,58	66,30 $\pm$ 19,71	62,02 $\pm$ 37,67
<b>(x10<sup>6</sup>/mL)</b>	(9,1/187,3)	(22,7/125,2)	(28,6/109,2)	(37,6/88,5)	(11,4/126,0)
<b>Concentração</b>	346,55 $\pm$ 336,74	369,52 $\pm$ 205,21	403,86 $\pm$ 108,64	461,21 $\pm$ 236,06	466,89 $\pm$ 258,88
<b>Total (x10<sup>6</sup>)</b>	(49,7/1095,6)	(146,8/800,7)	(219,5/573,1)	(174,0/844,1)	(115,9/822,0)

As variáveis seminais em relação às variações de temperatura e índice pluviométrico foram representadas em gráficos (Figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11).

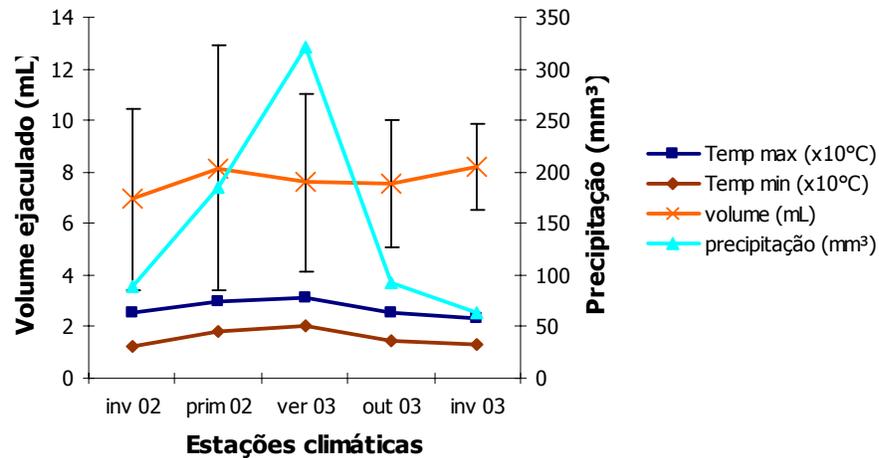


Figura 6. Volume médio ( $\pm$  desvio padrão) do ejaculado de oito cães reprodutores, temperatura máxima e mínima ( $\times 10^\circ\text{C}$ ) e a precipitação ( $\text{mm}^3$ ), no período de 14 meses, segundo a estação do ano, no município de Avaré, SP.

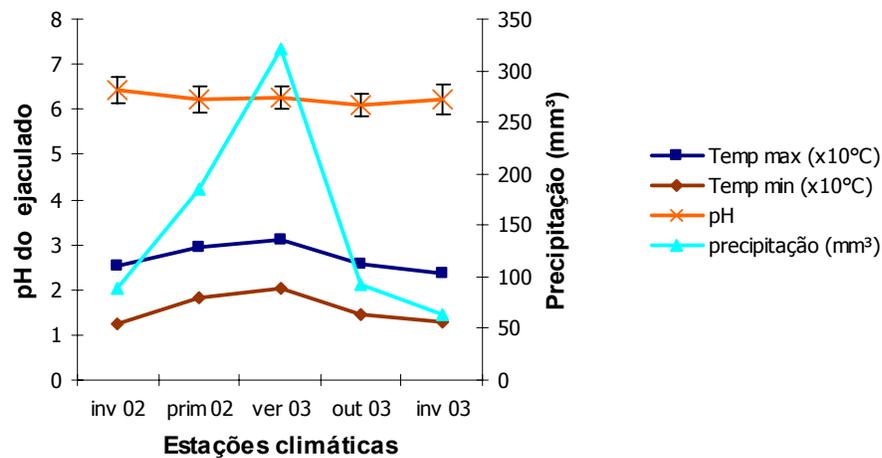


Figura 7. Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de pH do ejaculado de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $\times 10^\circ\text{C}$ ) e a precipitação ( $\text{mm}^3$ ), no período de 14 meses, segundo a estação do ano, no município de Avaré, SP.

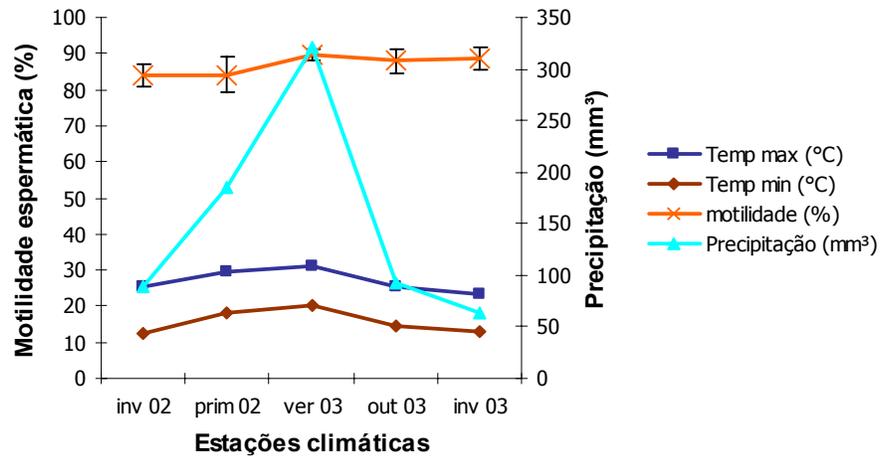


Figura 8. Motilidade média ( $\pm$  desvio padrão) do ejaculado de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $^{\circ}\text{C}$ ) e a precipitação ( $\text{mm}^3$ ), durante 14 meses, segundo as estações do ano, no município de Avaré, SP.

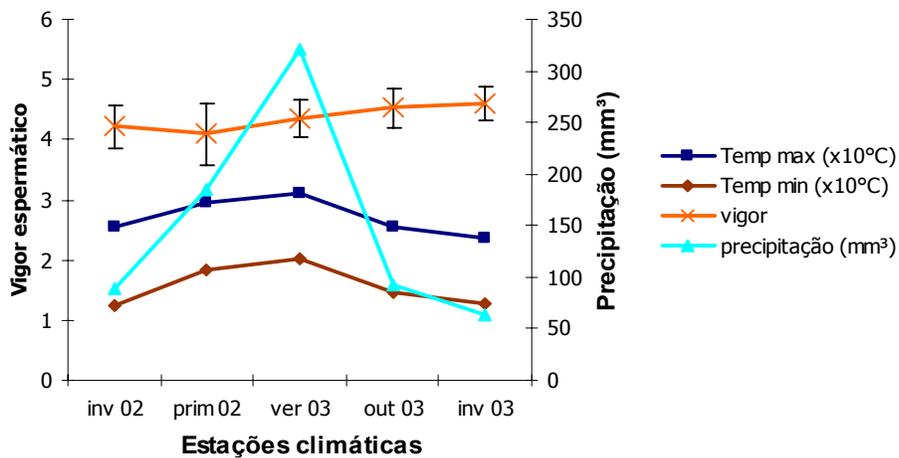


Figura 9. Vigor espermático médio ( $\pm$  desvio padrão) do ejaculado de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $\times 10^{\circ}\text{C}$ ) e a precipitação ( $\text{mm}^3$ ), durante 14 meses, segundo as estações do ano, no município de Avaré, SP.

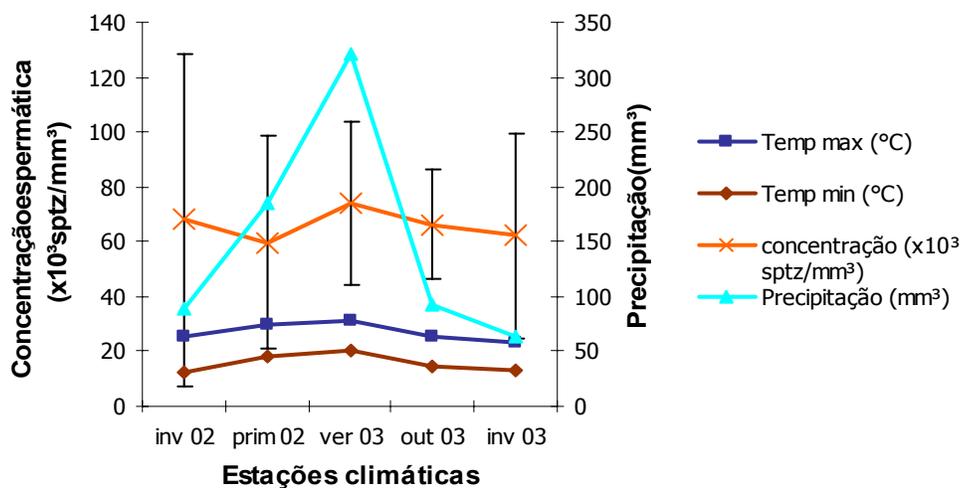


Figura 10. Concentração espermática média ( $\pm$  desvio padrão) no ejaculado de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $^{\circ}$ C) e a precipitação (mm<sup>3</sup>), durante 14 meses, segundo as estações do ano, no município de Avaré, SP.

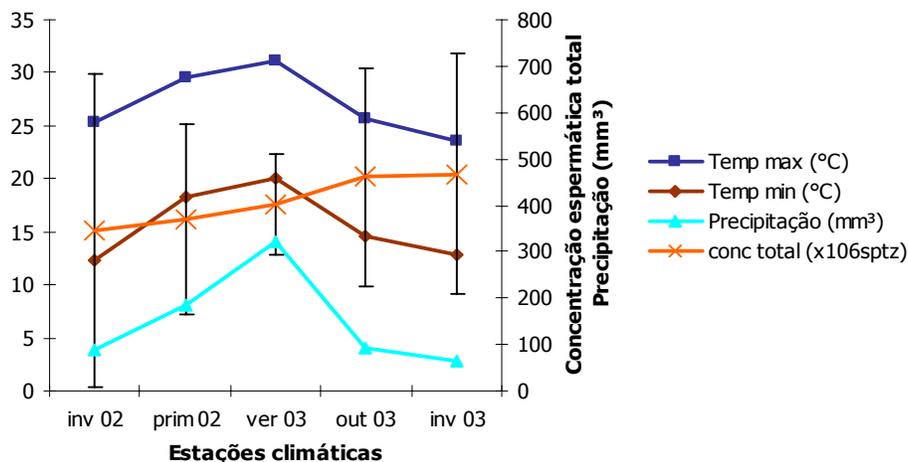


Figura 11. Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) do número total de espermatozoides no ejaculado de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $^{\circ}$ C) e a precipitação (mm<sup>3</sup>), durante 14 meses, segundo as estações do ano, no município de Avaré, SP.

Os resultados médios da morfologia espermática estão listados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores médios ( $\pm$  desvio padrão; valores mínimos/máximos) das alterações morfológicas espermáticas nos ejaculados de oito cães, durante 14 meses, segundo as estações do ano, no município de Avaré, SP.

<b>Morfologia</b>	<b>Inverno</b>	<b>Primavera</b>	<b>Verão</b>	<b>Outono</b>	<b>Inverno</b>
<b>sptz (%)</b>	<b>2002</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2003</b>	<b>2003</b>
<b>Defeitos</b>	11,95 $\pm$ 6,7	10,46 $\pm$ 5,5	12,67 $\pm$ 6,8	8,98 $\pm$ 6,8	10,3 $\pm$ 9,6
<b>menores</b>	(1 / 20,5)	(2 / 17,5)	(4 / 27,5)	(1,0 / 22,0)	(1 / 39)
<b>Defeitos</b>	24,94 $\pm$ 13,7	27,69 $\pm$ 10,8	22,35 $\pm$ 9,7	17,15 $\pm$ 6,8	16,4 $\pm$ 6,7
<b>Maiores</b>	(10 / 62,7)	(11 / 52,5)	(9 / 53,5)	(7,0 / 36,5)	(8 / 31)
<b>Defeitos</b>	36,90 $\pm$ 16,5	38,15 $\pm$ 14,3	35,02 $\pm$ 12,7	26,13 $\pm$ 11,7	26,7 $\pm$ 13,3
<b>totais</b>	(12 / 74,7)	(13 / 69,5)	(13 / 65,5)	(11,0 / 54,5)	(9 / 55)
<b>Normais</b>	61,48 $\pm$ 16,1	61,92 $\pm$ 14,3	65,48 $\pm$ 12,9	73,79 $\pm$ 11,5	73,5 $\pm$ 12,8
	(32,5 / 81)	(28,5 / 87)	(34,5 / 87)	(45,5 / 86,5)	(47 / 91)

### 5.3.2. Avaliação do sêmen após a descongelação

Os resultados de descongelação do sêmen mostraram uma diferença significativa do vigor em relação às estações do ano, entre verão e outono de 2003 ( $p=0,044$ ), como pode ser observado na Tabela 5

Tabela 5 – Valores médios ( $\pm$  desvio padrão; valores mínimos/máximos) de motilidade, vigor e integridade de membrana de espermatozóides descongelados provenientes de oito cães reprodutores, segundo as estações do ano, no município de Avaré, SP.

	<b>Inverno</b>	<b>Primavera</b>	<b>Verão</b>	<b>Outono</b>	<b>Inverno</b>
	<b>2002</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2003</b>	<b>2003</b>
<b>Motilidade</b>	53,5 $\pm$ 15,1	48,8 $\pm$ 15,2	54,9 $\pm$ 14,2	44,0 $\pm$ 13,1	44,9 $\pm$ 22,4
<b>(%)</b>	(35,8 / 80,8)	(28,0 / 70,8)	(35,8 / 72,5)	(21,7 / 60,8)	(2,0 / 77,5)
<b>Vigor</b>	2,7 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 0,4	2,8 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 1,0
<b>(0 – 5)</b>	(2,0 / 3,5)	(1,9 / 3,3)	(2,2 / 3,3)	(2,0 / 3,0)	(0,0 / 3,3)
<b>Membranas</b>	36,9 $\pm$ 5,7	40,0 $\pm$ 12,2	44,6 $\pm$ 8,0	37,2 $\pm$ 11,1	43,8 $\pm$ 14,6
<b>Íntegras (%)</b>	(30,8 / 48,3)	(22,7 / 58,8)	(35,0 / 53,2)	(24,8 / 60,3)	(11,5 / 61,0)

#### 5.4. MENSURAÇÃO PROSTÁTICA E TESTICULAR

Nas ultra-sonografias prostáticas realizadas durante o experimento, foi detectado em um animal da raça Springer Spaniel, no mês de janeiro, uma imagem compatível com prostatite, diagnóstico que foi confirmado com a enorme sensibilidade à palpação retal e presença de hemácias e neutrófilos no ejaculado, foi realizado antibióticoterapia durante 21 dias, sendo observado resolução do quadro. Num exame de um outro animal da mesma raça, nos meses de inverno de 2003, foram detectados alterações de ecogenicidade e aumento prostático, sinais sugestivos de hiperplasia prostática, por ser o cão mais velho do experimento (6 anos). Nos outros exames de ultra-som não

foram detectadas alterações na ecogenicidade e homogeneidade tanto na próstata como nos testículos.

As medidas de volume da próstata e testículos encontram-se representados na Tabela 6. Não foram detectadas diferenças significativas nos volumes testiculares e prostáticos ao longo dos 14 meses do experimento.

Tabela 6 – Média ( $\pm$  desvio padrão; valores mínimos/máximos) dos volumes testiculares e da próstata, de oito cães reprodutores, no período de 14 meses, segundo as estações climáticas, no município de Avaré, SP.

<b>Volume (cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Inverno 2002</b>	<b>Primavera 2002</b>	<b>Verão 2003</b>	<b>Outono 2003</b>	<b>Inverno 2003</b>
<b>Vol.</b>	13,5 $\pm$ 6,3	13,6 $\pm$ 4,2	12,5 $\pm$ 4,3	12,2 $\pm$ 3,4	11,0 $\pm$ 4,3
<b>Test. Direito</b>	(2,5 / 21,7)	(8,6 / 19,1)	(7,1 / 18,9)	(6,9 / 16,9)	(4,6 / 18,4)
<b>Vol.</b>	13,4 $\pm$ 6,1	12,1 $\pm$ 3,8	12,2 $\pm$ 4,2	12,0 $\pm$ 4,1	11,4 $\pm$ 4,3
<b>Test. Esquerdo</b>	(5,5 / 24,7)	(8,2 / 19,8)	(7,8 / 17,9)	(6,0 / 17,1)	(6,7 / 17,6)
<b>Vol. Test.</b>	26,9 $\pm$ 12,0	25,7 $\pm$ 7,6	24,7 $\pm$ 8,3	24,2 $\pm$ 7,3	22,4 $\pm$ 8,1
<b>Combinado</b>	(7,9 / 46,4)	(16,8/ 37,7)	(15,5/ 35,3)	(12,9/ 33,8)	(12,2/ 34,5)
<b>Vol. Prostático</b>	14,7 $\pm$ 6,6	13,7 $\pm$ 5,7	11,6 $\pm$ 4,1	12,6 $\pm$ 4,4	11,4 $\pm$ 6,2
	(6,7 / 24,2)	(6,2 / 22,0)	(6,4 / 17,3)	(6,4 / 18,8)	(4,2 / 23,4)

## 5.5. COMPONENTES BIOQUÍMICOS DO PLASMA SEMINAL

As concentrações médias dos componentes bioquímicos do plasma seminal estão representadas na Tabela 7.

As Figuras 12, 13, 14, 15, 16 e 17 representam as variações médias de proteína total, sódio, potássio, cloretos totais, cálcio e magnésio,

respectivamente, em relação às variações de temperatura e índice pluviométrico, nas diferentes estações climáticas.

Tabela 7 – Valores médios ( $\pm$  desvio padrão; valores mínimos/máximos) das concentrações de proteína total, sódio, potássio, cloretos totais, cálcio e magnésio no plasma seminal de oito cães reprodutores, durante 14 meses, segundo as estações climáticas, no município de Avaré, SP.

	<b>Inverno</b>	<b>Primavera</b>	<b>Verão</b>	<b>Outono</b>	<b>Inverno</b>
	<b>2002</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2003</b>	<b>2003</b>
<b>Proteína</b>	2,89 $\pm$ 0,79	2,82 $\pm$ 0,91	2,81 $\pm$ 0,70	3,26 $\pm$ 0,86	3,25 $\pm$ 0,76
<b>(ng/dL)</b>	(1,7 / 3,9)	(1,19 / 3,81)	(1,99 / 4,12)	(2,49 / 4,71)	(2,24 / 4,46)
<b>Sódio</b>	146,0 $\pm$ 5,43	149,0 $\pm$ 7,12	142,9 $\pm$ 7,94	146,9 $\pm$ 3,21	148,7 $\pm$ 5,29
<b>(mEq/L)</b>	(139,4/154,5)	(141,8/162,5)	(123,2/152,2)	(141,2/150,0)	(140,2/157,0)
<b>Potássio</b>	9,38 $\pm$ 2,67	9,64 $\pm$ 2,48	8,85 $\pm$ 1,97	9,19 $\pm$ 2,46	9,92 $\pm$ 2,34
<b>(mEq/L)</b>	(6,5 / 13,2)	(6,0 / 12,5)	(6,5 / 11,6)	(5,8 / 12,7)	(7,0 / 14,0)
<b>Cloretos</b>	168,31 <sup>a</sup> $\pm$ 9,2	162,91 $\pm$ 13,2	151,87 <sup>b</sup> $\pm$ 10,9	160,35 $\pm$ 14,4	156,25 $\pm$ 8,3
<b>(mEq/L)</b>	(156,8/185,1)	(144,8/180,4)	(137,0/171,3)	(141,9/186,0)	(140,1/167,6)
<b>Cálcio</b>	0,61 $\pm$ 0,14	0,65 $\pm$ 0,17	0,69 $\pm$ 0,21	0,78 $\pm$ 0,26	0,75 $\pm$ 0,26
<b>(mEq/L)</b>	(0,44 / 0,76)	(0,44 / 0,92)	(0,45 / 0,98)	(0,45 / 1,21)	(0,45 / 1,24)
<b>Magnésio</b>	2,70 $\pm$ 9,22	2,80 $\pm$ 13,24	2,87 $\pm$ 10,92	3,34 <sup>a</sup> $\pm$ 14,37	3,42 <sup>b</sup> $\pm$ 8,34
<b>(mg/L)</b>	(1,7 / 3,6)	(1,7 / 3,9)	(2,2 / 4,2)	(2,2 / 4,3)	(2,5 / 4,1)

Letras diferentes apresentam diferenças significativas para  $p < 0,01$ .

Foram verificadas diferenças significativas nas concentrações de cloretos totais ( $p=0,0013$ ) e magnésio ( $p=0,009$ ), relacionadas às estações climáticas.

As diferenças nas concentrações de cloretos totais foram observadas entre o inverno 2002 e o verão 2003. Para o magnésio as diferenças ocorreram entre os períodos inverno de 2002 e outono e inverno de 2003

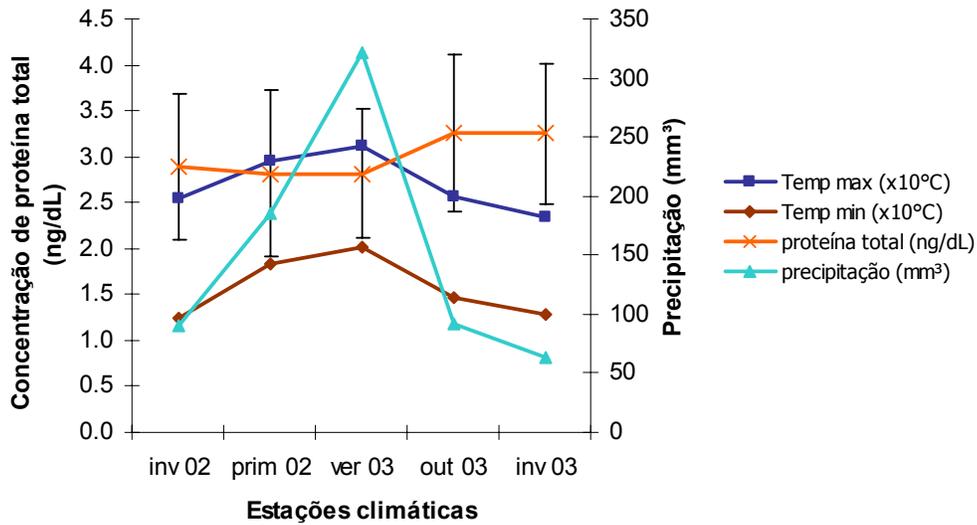


Figura 12. Concentrações médias ( $\pm$  desvio padrão) de proteína total no plasma seminal de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $\times 10^\circ\text{C}$ ) e a precipitação pluviométrica ( $\text{mm}^3$ ), durante 14 meses, segundo as estações climáticas, no município de Avaré, SP.

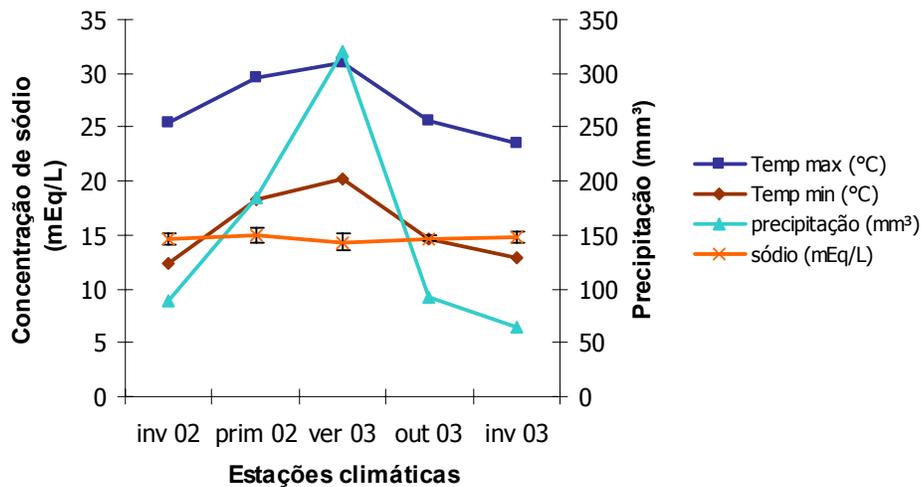


Figura 13. Concentrações médias ( $\pm$  desvio padrão) de sódio no plasma seminal de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $^\circ\text{C}$ ) e a precipitação pluviométrica ( $\text{mm}^3$ ), durante 14 meses, segundo as estações climáticas, no município de Avaré, SP.

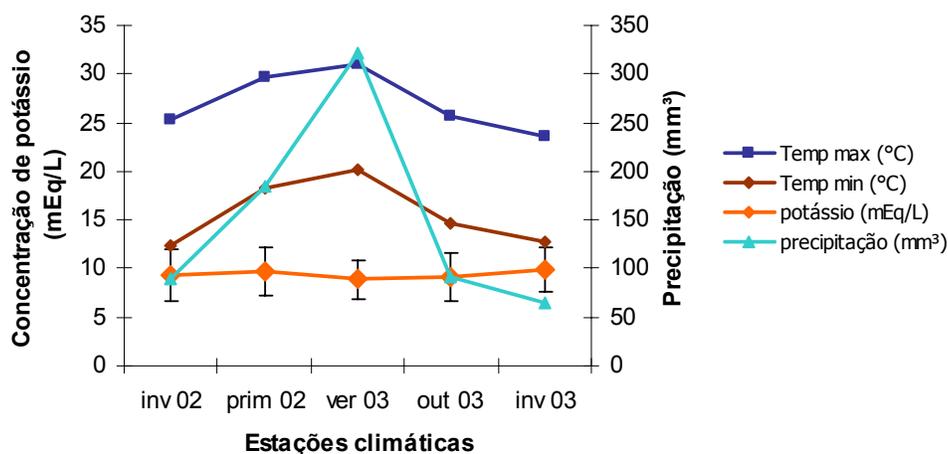


Figura 14. Concentrações médias ( $\pm$  desvio padrão) de potássio no plasma seminal de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $^{\circ}\text{C}$ ) e a precipitação pluviométrica ( $\text{mm}^3$ ), no período de 14 meses, segundo as estações climáticas, no município de Avaré, SP.

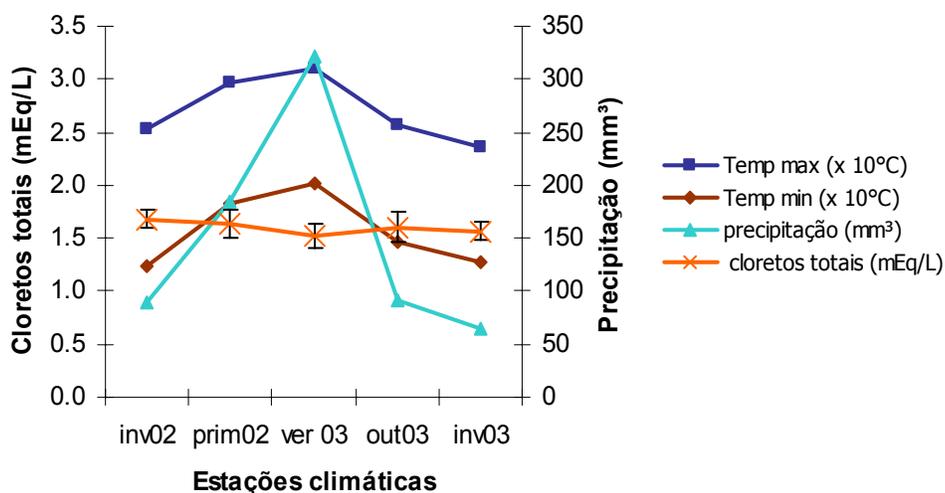


Figura 15. Concentrações médias ( $\pm$  desvio padrão) de cloretos totais no plasma seminal de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $\times 10^{\circ}\text{C}$ ) e a precipitação pluviométrica ( $\text{mm}^3$ ), no período de 14 meses, segundo as estações climáticas, no município de Avaré, SP.

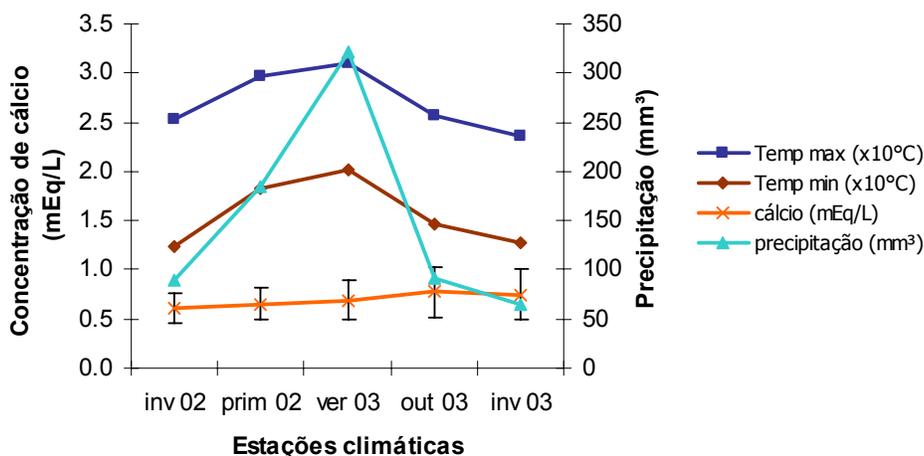


Figura 16. Concentrações médias ( $\pm$  desvio padrão) de cálcio no plasma seminal de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $\times 10^{\circ}\text{C}$ ) e a precipitação pluviométrica ( $\text{mm}^3$ ), no período de 14 meses, segundo as estações climáticas, no município de Avaré, SP.

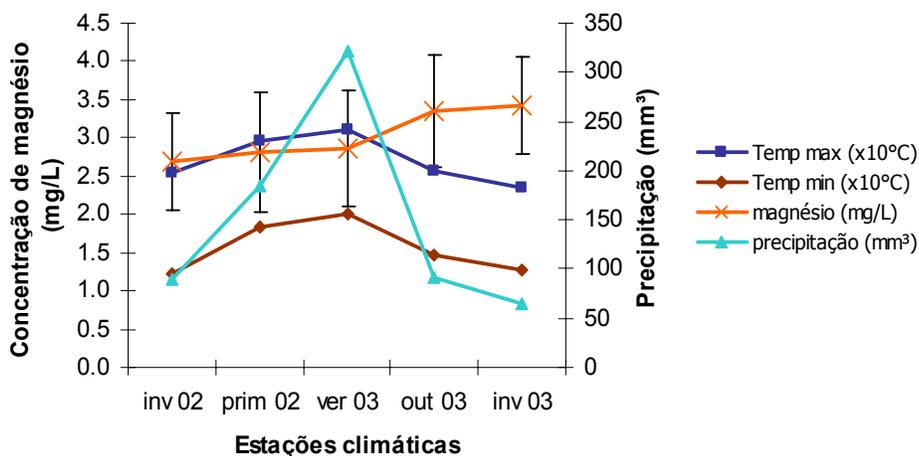


Figura 17. Concentrações médias ( $\pm$  desvio padrão) de magnésio no plasma seminal de oito cães reprodutores, temperaturas máxima e mínima ( $\times 10^{\circ}\text{C}$ ) e a precipitação pluviométrica ( $\text{mm}^3$ ), no período de 14 meses, segundo as estações climáticas, no município de Avaré, SP.

## 5.6. PERFIL ELETROFORÉTICO

O perfil protéico do plasma seminal dos oito cães está representado nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Médias da densidade óptica integrada (IOD) das bandas protéicas e seus pesos moleculares (kDa) detectadas no gel de separação de 12%, do plasma seminal de oito cães, nas diferentes estações climáticas, no período de 14 meses, no município de Avaré, SP.

Bandas	Peso	Inverno	Primavera	Verão	Outono	Inverno
	Molecular	2002	2002	2003	2003	2003
<b>B1</b>	139,63	61,6	-	-	-	-
<b>B2</b>	73,25	49,11	55,07	50,30	54,92	59,32
<b>B3</b>	66,27	59,68	72,35	54,88	62,50	63,69
<b>B4</b>	57,13	42,90	51,50	50,50	54,89	57,00
<b>B5</b>	49,15	49,43	58,46	62,38	69,89	63,79
<b>B6</b>	42,93	45,53	44,54	44,67	48,12	42,26
<b>B7</b>	39,20	40,30	42,19	47,70	54,11	57,58
<b>B8</b>	34,38	40,69	42,78	44,67	46,33	51,76
<b>B9</b>	32,84	44,23	46,55	48,10	51,96	48,53
<b>B10</b>	31,38	59,38	58,01	61,57	73,99	74,24
<b>B11</b>	30,03	87,97	96,65	91,64	103,70	108,93
<b>B12</b>	27,44	70,06	75,87	87,64	103,42	97,40
<b>B13</b>	24,84	46,38	49,34	46,47	54,26	51,72
<b>B14</b>	23,38	47,42	54,25	49,92	61,08	59,70
<b>B15</b>	21,19	46,86	49,74	53,01	63,91	60,96
<b>B16</b>	19,43	54,69	58,92	64,72	71,31	69,24
<b>B17</b>	16,66	65,94	62,60	67,10	76,31	75,22
<b>B18</b>	15,59	162,91	160,51	178,48	188,81	183,54

Tabela 9. Médias da densidade óptica integrada (IOD) das bandas protéicas e seus pesos moleculares (kDa) detectadas no gel de separação de 18%, do plasma seminal de oito cães, nas diferentes estações climáticas, no período de 14 meses, no município de Avaré, SP.

Bandas	PM	Inverno	Primavera	Verão	Outono	Inverno
	(kDa)	2002	2002	2003	2003	2003
<b>B19</b>	15,29	410,28	407,09	411,37	395,22	392,92
<b>B20</b>	13,68	96,25	92,78	105,16	94,15	103,16
<b>B21</b>	12,48	106,27	119,32	112,80	116,18	111,07
<b>B22</b>	11,33	113,62	120,29	112,15	112,46	110,56
<b>B23</b>	10,29	114,47	124,75	101,59	101,42	104,57
<b>B24</b>	8,99	89,22	72,32	93,00	94,65	99,86
<b>B25</b>	7,70	86,64	91,26	90,85	89,20	96,56
<b>B26</b>	6,39	76,43	74,25	71,72	73,76	69,98
<b>B27</b>	5,14	90,35	103,47	87,15	89,28	85,63
<b>B28</b>	4,02	112,91	105,17	112,93	104,25	94,87
<b>B29</b>	3,31	94,32	115,46	120,24	105,61	113,35
<b>B30</b>	2,84	51,66	56,09	48,12	44,47	49,12
<b>B31</b>	2,71	50,85	50,18	44,85	43,18	52,29

No gel a 12% foram identificadas 10 Bandas comuns a todos os animais e estiveram presentes em todas as estações climáticas (73,2 kDa; 66,3 kDa; 57,1 kDa; 49,1 kDa; 32,8 kDa; 31,4 kDa; 23,4 kDa; 21,2 kDa; 16,7 kDa; 15,6 kDa).

Em um animal da raça Springer Spaniel, a Banda 8 (34,38 kDa) não foi detectada nos dois períodos de inverno e a Banda 7 (39,20 kDa) foi identificada apenas na primavera 2002. Num segundo animal da mesma raça

a Banda 11 (30,03 kDa) só foi observada no verão 2003. Em um animal da raça Blood Hound a Banda 16 (19,43 kDa) não foi identificada.

No gel de 18% cinco bandas protéicas (15,29 kDa; 13,68 kDa; 11,33 kDa; 10,29 kDa; 2,71 kDa) foram comuns a todos os cães no período estudado.

## 5.8. CORRELAÇÕES DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS

A correlação de Pearson, para medidas lineares identificou uma correlação ( $r=-0,86$  com  $p=0,059$ ) entre as dosagens de testosterona e as variáveis ambientais.

Foram detectadas correlações positivas entre defeitos menores de cabeça ( $r= 0,774$ ), defeitos totais de cabeça ( $r=0,617$ ) e total de defeitos menores ( $r=0,576$ ) e os índices de precipitação ( $p=0,0012$ ,  $p=0,0308$  e  $p=0,0185$ , respectivamente).

Entre as variáveis defeitos de acrossomo e defeitos maiores de cauda foi identificada correlação positiva ( $r=0,542$  e  $r=0,550$ , respectivamente) e significativa ( $p=0,0451$  e  $p=0,0415$ ) com temperaturas máximas.

A análise de correlação canônica identificou um par de correlações significativas ( $p=0,0018$ ), que explica 91% da variabilidade das inter-relações entre as variáveis seminais e ambientais. A variável canônica refletindo as características do sêmen se correlacionou positivamente com concentração espermática ( $r=0,36$ ) e negativamente com vigor espermático ( $r=-0,37$ ) e a variável canônica refletindo as variações ambientais se correlacionou com temperatura média ( $r=0,99$ ) e índice pluviométrico ( $r=0,78$ ).

---

A análise de correlação canônica explicou 64% da variabilidade das inter-relações das variáveis: morfologia espermática e condições ambientais, ( $p=0,0012$ ). A variável defeitos menores de cabeça foi altamente correlacionada ( $r=0,78$ ) com a variável canônica, índice de precipitação ( $r=0,82$ ), que reflete as variações do ambiente no período estudado.

Não foram identificadas correlações entre as alterações da qualidade do sêmen pós-descongelamento e as alterações climáticas ao longo dos 14 meses de experimento.

Foi identificada correlação negativa e significativa ( $p=0,0089$ ) entre as concentrações de proteínas totais ( $r=-0,668$ ) e a temperatura máxima. Foi detectada também correlação significativa ( $p=0,0187$ ), entre os cloretos totais do plasma seminal ( $r=-0,617$ ) e as temperaturas mínimas.

Dentre as variáveis bioquímicas, as concentrações de potássio apresentaram correlação negativa ( $r=-0,578$ ) com o índice de precipitação ( $p=0,0304$ ).

As relações entre as variáveis seminais e bioquímicas foram investigadas pela análise de correlação canônica. Esta análise identificou dois pares de correlações canônicas significativos ( $p=0,0001$  e  $p=0,0069$ ), sendo que estes explicam 86% da variabilidade das inter-relações das variáveis, o primeiro par indicou uma relação inversa entre motilidade espermática ( $r=-0,74$ ), volume ejaculado ( $r=-0,58$ ) com cloretos totais ( $r=0,95$ ).

No perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal somente a banda protéica B10 (31,38 kDa) teve uma correlação negativa ( $r=-0,569$ ) e estatisticamente significativa ( $p=0,033$ ) com a temperatura máxima.

---

Na análise de correlação entre o perfil eletroforético e as análises seminais, foram identificadas correlações negativas ( $p < 0,01$ ) entre as bandas B11 ( $r = -0,272$ ), B24 ( $r = -0,246$ ) e B29 ( $r = -0,521$ ), e correlações positivas entre as bandas B23 ( $r = 0,209$ ) e B28 ( $r = 0,580$ ) e o volume do ejaculado. Somente a banda B23 ( $r = -0,289$ ) apresentou correlação significativa ( $p = 0,003$ ) com a motilidade do sêmen. O vigor teve correlação positiva ( $p < 0,05$ ) com as bandas B18 ( $r = 0,199$ ) e B26 ( $r = 0,359$ ).

As correlações detectadas entre o pH do ejaculado, a concentração espermática por mL e a concentração total do ejaculado e o perfil eletroforético protéico estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10. Valores do coeficiente de correlação (r) entre as médias das densitometrias ópticas das diferentes bandas protéicas (B), considerando as variáveis seminais: pH, concentração (espermatozoides/mL), número total de espermatozoides (ntotal).

<b>Bandas (kDa)</b>	<b>pH</b>	<b>conc</b>	<b>ntotal</b>
<b>B2 (73,25)</b>	0,3267*	0,0692	-0,0018
<b>B3 (66,27)</b>	0,4766*	-0,1320	-0,2743*
<b>B4 (57,13)</b>	0,3196*	-0,1998**	-0,2469 *
<b>B5 (49,15)</b>	0,3953*	-0,1854	-0,1990**
<b>B6 (42,93)</b>	0,2972	-0,4329**	-0,3754**
<b>B7 (39,20)</b>	0,2919*	-0,1906	-0,1157
<b>B8 (34,38)</b>	0,3379*	-0,1701	-0,1756
<b>B9 (32,84)</b>	0,2451*	-0,1619	-0,2052*
<b>B10 (31,38)</b>	-0,1394	0,0716	-0,0759
<b>B11 (30,03)</b>	0,0341	0,1682	-0,0273
<b>B12 (27,44)</b>	0,3344*	-0,3083*	-0,2553*
<b>B13 (24,84)</b>	-0,3633*	-0,1522	-0,1642
<b>B14 (23,38)</b>	0,1689	-0,1424	-0,1626
<b>B15 (21,19)</b>	0,0973	-0,1696	-0,1059
<b>B16 (19,43)</b>	-0,2012	-0,2393**	-0,1761
<b>B17 (16,66)</b>	0,1771	-0,1980**	-0,1430
<b>B18 (15,59)</b>	-0,3412*	0,2509*	0,1249
<b>B19 (15,29)</b>	0,4609*	-0,2490*	-0,2466*
<b>B20 (13,68)</b>	0,2861*	-0,0631	-0,1414
<b>B21 (12,48)</b>	0,1677	-0,0719	-0,0827
<b>B22 (11,33)</b>	0,2149**	0,0293	-0,0284
<b>B23 (10,29)</b>	0,2035**	-0,1662	-0,0857
<b>B24 (8,99)</b>	0,0634	0,2357**	0,0717
<b>B25 (7,70)</b>	0,3393*	-0,2201**	-0,2092**
<b>B26 (6,39)</b>	0,0938	0,2934*	0,2729*
<b>B27 (5,14)</b>	0,1806	-0,3481*	-0,3035*
<b>B28 (4,02)</b>	0,1883	-0,1844	0,1909
<b>B29 (3,31)</b>	-0,0310	0,4249	0,5595**
<b>B30 (2,84)</b>	0,3995*	-0,1599	-0,1031
<b>B31 (2,71)</b>	0,4273*	-0,0637	-0,1375

\*p<0,01 e \*\*p<0,05

As correlações entre o perfil eletroforético protéico e as variáveis seminais analisadas após a descongelação foram apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11. Valores do coeficiente de correlação (r) entre as médias das densitometrias ópticas das diferentes bandas protéicas (B), considerando as variáveis seminais após a descongelação: motilidade (%), vigor, membranas íntegras (%).

<b>Bandas (kDa)</b>	<b>Motilidade</b>	<b>Vigor</b>	<b>Membrana íntegra</b>
<b>B2 (73,25)</b>	-0,4078*	-0,2055	-0,2393
<b>B3 (66,27)</b>	-0,5233*	-0,3217**	-0,4148*
<b>B4 (57,13)</b>	-0,6684*	-0,4847*	-0,5179 *
<b>B5 (49,15)</b>	-0,5013*	-0,2741*	-0,2894**
<b>B6 (42,93)</b>	-0,6134*	-0,5277*	-0,3996
<b>B7 (39,20)</b>	-0,5320*	-0,3788*	-0,3522*
<b>B8 (34,38)</b>	-0,5002*	-0,4174*	-0,3102**
<b>B9 (32,84)</b>	-0,4059*	-0,1911	-0,2784**
<b>B10 (31,38)</b>	-0,1255	-0,0993	-0,0746
<b>B11 (30,03)</b>	-0,0116	0,0116	0,1456
<b>B12 (27,44)</b>	-0,6279*	-0,4595*	-0,4835*
<b>B13 (24,84)</b>	-0,6646*	-0,5113*	-0,4869*
<b>B14 (23,38)</b>	-0,4097*	-0,2285	-0,2190
<b>B15 (21,19)</b>	-0,3747*	-0,2026	-0,1711
<b>B16 (19,43)</b>	-0,1151	-0,0654	-0,1655
<b>B17 (16,66)</b>	-0,3192**	-0,2031	-0,1361
<b>B18 (15,59)</b>	0,2621**	0,1535	0,2911**
<b>B19 (15,29)</b>	-0,3221**	-0,1320	-0,2233
<b>B20 (13,68)</b>	-0,1972	-0,0754	0,0183
<b>B21 (12,48)</b>	-0,1269	0,0316	-0,0007
<b>B22 (11,33)</b>	0,0437	0,1837	0,1432
<b>B23 (10,29)</b>	0,0455	0,1504	-0,0236
<b>B24 (8,99)</b>	0,1280	0,1520	0,2313
<b>B25 (7,70)</b>	-0,2315	-0,0433	-0,0844
<b>B26 (6,39)</b>	0,1909	0,1541	0,3341**
<b>B27 (5,14)</b>	-0,0240	0,1403	0,0903
<b>B28 (4,02)</b>	0,4032	0,3012	0,1653
<b>B29 (3,31)</b>	0,3817	0,2511	0,6046
<b>B30 (2,84)</b>	-0,2606	-0,1383	-0,2287
<b>B31 (2,71)</b>	-0,3531*	-0,3023**	-0,2723**

\* p<0,01 \*\* p<0,05

Na Tabela 12 estão listadas as correlações entre o perfil eletroforético protéico e as análises bioquímicas do plasma seminal.

Tabela 12. Valores do coeficiente de correlação (r) entre as médias das densitometrias ópticas das diferentes bandas proteicas (B), considerando as variáveis bioquímicas: cloretos totais (Cl), sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg).

<b>Bandas (kDa)</b>	<b>Cl</b>	<b>Na</b>	<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>
<b>B2 (73,25)</b>	-0,1569	-0,0274	-0,2409*	-0,1204	-0,2263**
<b>B3 (66,27)</b>	-0,0620	-0,1479	-0,3571*	-0,2378*	-0,4008*
<b>B4 (57,13)</b>	-0,1983**	-0,0521	-0,3488*	-0,3246*	-0,2122**
<b>B5 (49,15)</b>	-0,2534*	-0,0294	-0,1346	-0,0575	-0,1401
<b>B6 (42,93)</b>	0,1569	0,1301	-0,0947	-0,3292	-0,3067
<b>B7 (39,20)</b>	-0,3175*	-0,0425	-0,1739	-0,1572	-0,0634
<b>B8 (34,38)</b>	-0,2243**	-0,0295	-0,1718	-0,1767	-0,1629
<b>B9 (32,84)</b>	-0,1084	0,0615	-0,0843	-0,0785	-0,1554
<b>B10 (31,38)</b>	0,1176	-0,0515	-0,0976	-0,1839	-0,1856
<b>B11 (30,03)</b>	0,3264*	0,2463**	0,2501*	0,6216*	0,1486
<b>B12 (27,44)</b>	-0,3726*	-0,0112	-0,1595	-0,2673*	0,0475
<b>B13 (24,84)</b>	-0,2183**	-0,1876	-0,3216*	-0,3243*	-0,3208*
<b>B14 (23,38)</b>	-0,0950	-0,0169	-0,1333	-0,0958	-0,1613
<b>B15 (21,19)</b>	-0,2056**	0,0356	-0,0475	-0,0969	-0,0207
<b>B16 (19,43)</b>	-0,0250	-0,0362	-0,1438	-0,1262	-0,0068
<b>B17 (16,66)</b>	-0,1238	-0,1412	-0,1093	-0,1722	-0,1077
<b>B18 (15,59)</b>	0,1895**	-0,1165	0,1237	-0,1958**	-0,0506
<b>B19 (15,29)</b>	-0,1237	0,1949**	0,0796	0,28703*	-0,0044
<b>B20 (13,68)</b>	-0,0206	-0,0383	0,1305	0,0466	-0,1371
<b>B21 (12,48)</b>	-0,0382	0,2184**	0,3065*	0,2442*	0,1774
<b>B22 (11,33)</b>	-0,0040	0,0663	0,0819	0,1487	-0,1344
<b>B23 (10,29)</b>	0,0897	0,1214	-0,0098	0,1544	-0,1312
<b>B24 (8,99)</b>	0,0529	-0,0711	0,0439	0,2308**	0,0650
<b>B25 (7,70)</b>	-0,1107	-0,1412	0,0759	0,1827	-0,0748
<b>B26 (6,39)</b>	-0,0274	-0,0956	0,1679	-0,0941	-0,0671
<b>B27 (5,14)</b>	-0,1092	0,2182	0,4386*	0,0261	0,0462
<b>B28 (4,02)</b>	-0,3700**	-0,1418	-0,2108	-0,4258**	-0,4536*
<b>B29 (3,31)</b>	-0,2757	0,3623	0,3226	0,2851	0,0432
<b>B30 (2,84)</b>	-0,0474	-0,0925	-0,0763	-0,2079**	-0,0886
<b>B31 (2,71)</b>	-0,0519	-0,0726	-0,1030	-0,2807*	-0,3047*

\* p<0,01    \*\* p<0,05



*DISCUSSÃO*

---

## 6. DISCUSSÃO

Os cães foram os primeiros animais a serem domesticados, porém as pesquisas sobre a fisiologia básica ainda são escassas e necessárias. O cão é um ótimo modelo experimental tanto para aplicação de biotecnologias nas espécies selvagens, bem como para o estudo de algumas afecções nos homens.

O desenvolvimento na criação comercial de cães, assim como a conscientização da necessidade de preservação das espécies canídeas selvagens e o controle populacional de cães errantes impulsionaram as pesquisas no âmbito reprodutivo no mundo e no nosso país. É importante registrar que esse interesse maior é recente, cerca de 10 a 15 anos.

No Brasil, pesquisas nesta área iniciaram-se pela transferência de técnicas reprodutivas dos animais de produção para os caninos e pela importação de tecnologias, principalmente da Europa e dos Estados Unidos.

Embora muitas destas tecnologias possam ser aplicadas no Brasil, as diferenças ambientais devem ser consideradas. Uma questão importante é o conhecimento a respeito da atividade reprodutiva de cães machos criados no hemisfério sul, especificamente na região sudeste do Brasil. Esta região é caracterizada por mudanças ambientais pouco intensas, com pequenas alterações no fotoperíodo, cerca de duas horas e meia entre o solstício de

---

inverno e de verão e modificações maiores, centradas em temperaturas elevadas e índices pluviométricos, num determinado período do ano.

Embora o efeito do fotoperíodo provavelmente desapareça em animais que vivem abaixo da latitude 30°, além das variações de temperatura menos intensas, existe uma marcada variação estacional na precipitação pluviométrica (BRONSON & HEIDEMAN, 1994).

Todo mecanismo de controle endócrino da reprodução nos machos pode sofrer influência da sazonalidade (HAFEZ, 1987). A espermatogênese e a esteroidogênese são processos intimamente relacionados, mas ocorrem em áreas distintas dos testículos. A espermatogênese ocorre dentro dos túbulos seminíferos, que consistem de espermatogônias e células de Sertoli. E a esteroidogênese ocorre no tecido intersticial testicular, que é composto pelas células de Leydig. A libido e a produção espermática são dependentes do eixo hipotálamo – hipófise - testículos. Dois sistemas hormonais existem no trato reprodutivo dos machos, um envolvendo GnRH hipotalâmico - LH hipofisário – testosterona testicular e outro envolvendo GnRH - FSH hipofisário - inibina testicular (HEWITT, 1998).

A mensuração da testosterona sérica e concentração de gonadotrofinas proporcionam informações sobre o “status” funcional do eixo hipotalâmico - hipofisário - testicular (FELDMAN & NELSON, 2004).

Um dos animais do experimento apresentou um padrão hormonal muito díspare dos restantes e, para evitar uma distorção dos resultados, foi excluindo das análises posteriores. Esse cão apresentou um perfil totalmente diferente do outro da mesma raça, o que pode estar relacionado a diferenças

---

nos ritmos circadianos e circanuais (DEPALATIS et al., 1978).

Nesse estudo foi detectada uma diminuição significativa nas dosagens de testosterona no verão (**1,31 ± 0,52 ng/mL**), período de temperaturas ambientais mais elevadas e altos índices pluviométricos, quando comparado à primavera (**1,93 ± 0,38 ng/mL**) e ao outono (**2,02 ± 0,98 ng/mL**). Esses resultados concordam com os obtidos por FALVO et al. (1980) que observaram uma elevação significativa na concentração de testosterona no início do outono. A sazonalidade na produção de testosterona também foi descrita por HEWITT (1998), o qual verificou uma variação de 0,5 a 1,5 ng/mL e picos de 3,5 a 6,0 ng/mL, porém não mencionou as estações estudadas. Entretanto, TAHA et al. (1981) não detectaram variação sazonal relacionada às concentrações de testosterona ao avaliarem cães criados no hemisfério norte.

Os resultados do presente estudo mostraram uma variação sazonal dos níveis de testosterona dependente do índice pluviométrico (**r=-0,86, p=0,059**). Também foi visto uma variação individual importante entre os animais, o que pode ser explicado pelo número pequeno de machos avaliados e, possivelmente, pelas diferenças raciais.

Uma das dificuldades ao estudar o perfil hormonal, além da variação individual, é a obtenção de um grande número de cães da mesma raça e submetidos ao mesmo manejo. Embora nesse estudo, com o intuito de diminuir os efeitos externos, os animais tenham recebido a mesma alimentação, mesmo manejo e as colheitas realizadas num mesmo horário e na mesma seqüência, ocorreu uma variação individual importante, também

---

descrita por TAHA et al. (1981).

Apesar de ter sido identificada uma variação sazonal nas concentrações de testosterona, os valores mínimos se mantiveram dentro da variação normal para a espécie, ou seja, houve uma diminuição nas concentrações de testosterona no verão, mas não o suficiente para caracterizar uma inatividade testicular. Fato que ocorre nas raposas azul e vermelha, que apresentam testículos pequenos e inativos durante o verão e outono (FORSBERG et al., 1989).

Nos machos adultos das raposas azul e vermelha a produção máxima de testosterona é coincidente com a estação reprodutiva (FARSTAD, 1998). A produção de testosterona também é mais pronunciada no período de primavera nos lobos prata (FORSBERG et al., 1989).

A concentração de testosterona intratesticular é cerca de 50 a 100 vezes maior que a testosterona sérica (FELDMAN & NELSON, 2004); isso significa que níveis baixos de testosterona sérica nem sempre estão relacionados com uma queda na produção espermática. Portanto, uma sazonalidade mais pronunciada poderia ser evidenciada na testosterona intratesticular.

Os resultados médios dos parâmetros seminais desse trabalho, no período de 14 meses, encontraram-se dentro dos valores normais para a espécie, com exceção da porcentagem de defeitos totais, que ficaram acima do aceitável pelo CBRA (20%). Durante todo o período avaliado a porcentagem média de células normais foi maior que **61%**. Embora o número de células morfológicamente anormais tenha sido alto, acredita-se

---

que a fertilidade não tenha sido comprometida, pois segundo OETTLE (1993) a fertilidade é prejudicada quando a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais está abaixo de 60%. Entretanto, somente os resultados da fertilidade *in vivo* desses cães é que pode avaliar o efeito das alterações de morfologia.

Nos cães diferentemente das espécies de produção, não existem estudos relacionando casos de subfertilidade ou infertilidade com porcentagens e classificação dos defeitos espermáticos. Neste estudo foi verificada uma porcentagem alta de defeitos maiores, localizados principalmente na cauda e peça intermediária das células espermáticas, nos cães da raça **Springer Spaniel** e defeitos de acrossoma nos da raça **Golden Retriever**. Isso provavelmente pode estar relacionado a uma falta de controle no planejamento genético desses animais.

Dentro das características seminais, somente a motilidade espermática foi diferente nos períodos estudados, entre a primavera de 2002 e o verão de 2003 houve um aumento significativo dessa variável **(84,2% versus 89,6%)**.

As variações médias dos resultados das avaliações seminais encontradas neste trabalho, referentes aos resultados da avaliação seminal, foram semelhantes aos trabalhos realizados no hemisfério norte (KURODA & HIROE, 1972, TAKEISHI et al. 1975, TAHA et al., 1981) e superiores aos resultados encontrados por SCHÄFER et al. (1997). Essa variação pode ser devido às metodologias laboratoriais utilizadas.

Nos estudos realizados por KURODA & HIROE (1972) e TAKISHI et al.

---

(1975) foi observada uma queda na qualidade do sêmen no verão, contrariamente aos resultados do presente experimento, aos de TAHA et al. (1981) e SCHÄFER et al. (1997).

Diferentemente da maioria dos canídeos selvagens, que apresentam uma inatividade testicular na estação não reprodutiva das fêmeas (FARSTAD, 1998), os cães estudados permaneceram férteis durante todo o ano, da mesma forma que os eqüinos (HOFFMANN & LANDECK, 1999), ovinos (KARAGIANNIDIS et al., 2000a), caprinos (KARAGIANNIDIS et al., 2000b) e humanos (MALM et al., 2004). Existe uma interação complexa, entre o fotoperíodo e os mecanismos indutores endógenos que ocorrem dentro de cada espécie (GOODMAN, 1999).

Não foi encontrado na literatura consultada estudos relacionando o efeito da sazonalidade em cães com problemas de infertilidade, embora a sazonalidade tenha exercido um efeito deletério na qualidade do sêmen em estudos conduzidos em homens inférteis ou com fertilidade diminuída (CENTOLA & EBERLY, 1999, KÜNZLE et al., 2004).

Em relação à qualidade do sêmen após a criopreservação, foi observada uma variação individual intensa, sendo que alguns cães apresentaram resultados superiores a outros, durante todo o período experimental. Os animais das raças **Golden Retriever e Blood Hound** mostraram melhores resultados na descongelação do sêmen do que os cães da raça **Springer Spaniel**. Esse resultado mostra que os cães apresentam um padrão homogêneo de resposta das células espermáticas ao estresse da criopreservação, independente da estação do ano considerada.

---

Ainda considerando a raça **Springer Spaniel**, foi observada uma porcentagem alta de inserção abaxial da peça intermediária. Embora MIES FILHO (1987) não considere este um defeito espermático em eqüinos e caninos, essa alteração na morfologia da célula espermática poderia ser responsável por uma fragilidade maior dos espermatozoides quando submetidos ao estresse da criopreservação.

Quando se realizou comparação individual, foi evidenciado animais que demonstraram resultados opostos, um cão da raça **Golden Retriever** apresentou os melhores resultados na descongelação do sêmen durante todo o ano (**72% motilidade e 56% de células íntegras**) e um cão da raça **Springer Spaniel** os piores resultados (**28% motilidade e 26% de células íntegras**).

As médias dos resultados da descongelação evidenciaram diferença significativa na variável vigor espermático, com valores menores no outono de 2003, quando comparado com o verão de 2003 (**2,4 versus 2,8**). Foi verificada também uma tendência à diminuição em todas as outras variáveis avaliadas (**motilidade 54,9% versus 44,0%, membranas íntegras 44,6% versus 37,2%**).

Os melhores resultados na descongelação de sêmen neste trabalho foram obtidos no período do verão, resultados diferentes àqueles obtidos em lobos prata (FORSBERG et al., 1989), em búfalos (BAHGA & KHOKAR, 1991) e em eqüinos (JANETT et al., 2003a, 2003b).

Os resultados médios das mensurações testiculares e prostáticas não apresentaram variações sazonais significativas no período estudado. Porém,

---

os animais de porte menor (15 kg) apresentaram valores de volumes prostáticos e testiculares mais baixos e os de maior porte (45 kg) valores mais altos. Esses resultados estão de acordo com aqueles relatados por OLAR et al. (1983), AMANN (1986), HEWITT (1998) onde a massa testicular tem relação direta com o peso corpóreo.

Durante o período do estudo foi diagnosticado prostatite em um e hiperplasia prostática em outro animal da raça **Springer Spaniel**, afecções prostáticas que elevam as mensurações da glândula; esse fato pode ter mascarado as modificações sazonais que eventualmente tenham ocorrido durante as estações climáticas nos 14 meses de estudo.

Nos meses de verão, período em que foi detectada queda na concentração de testosterona, pôde ser observada, avaliando-se individualmente os cães, uma tendência à diminuição no volume prostático em seis dos oito animais, exceção foram os dois cães que apresentaram a prostatite e a hiperplasia prostática. Os volumes testiculares não apresentaram variações durante o todo o período considerado.

Os resultados nas mensurações da próstata e testículos são coerentes com os resultados das avaliações do sêmen, que também não sofreram alterações sazonais durante o período estudado, confirmando os resultados das mensurações encontrados por JOHNSON et al. (1994), WALKER (1999) e em ovinos por BICUDO (1998).

O plasma seminal exerce um importante papel na maturação do espermatozóide, através de processos enzimáticos e de modificação da superfície espermática. O plasma seminal contém uma variedade de

---

componentes bioquímicos, muitos dos quais são relativamente específicos para a regulação da função espermática (PÉREZ-PÉ et al., 2001b).

Em relação aos componentes bioquímicos do plasma seminal, as médias nos períodos estudados identificaram variações sazonais nas concentrações de cloretos totais e magnésio. Foi observada uma diminuição nos valores de cloretos totais no verão em relação ao inverno de 2002 **(151,9 versus 156,2)**. As concentrações deste eletrólito neste estudo foram superiores às obtidas por BARTLETT (1962) e inferiores às descritas por SOUZA (2003).

PANGAWKAR et al. (1988) relataram que os cloretos presentes no plasma seminal de bovinos se ligam à membrana do espermatozóide tornando-os vulneráveis às agressões externas. Nesse experimento foi identificada uma queda da concentração de cloretos no verão, período no qual a motilidade espermática foi maior. Portanto, sugere-se que os cloretos totais do plasma seminal de cães também exerçam um efeito deletério nas células espermáticas desta espécie.

Um aumento significativo foi evidenciado nas concentrações de magnésio nos períodos de outono e inverno de 2003 em relação ao inverno de 2002 **(3,34 mg/L e 3,42 mg/L versus 2,70 mg/L)**. As concentrações de magnésio deste estudo foram maiores que as detectadas por BARTLETT (1962) e CHATTERJEE et al. (1976). Embora somente entre essas três estações as diferenças nas concentrações de magnésio tenham sido significativas, pôde ser observado um aumento crescente deste eletrólito no plasma seminal durante o período estudado. Estudos têm relacionado as

---

concentrações de magnésio do plasma seminal ao transporte espermático (OMU et al., 2001), entretanto nesse experimento não foi identificado um efeito direto deste eletrólito nos parâmetros avaliados do sêmen.

Neste estudo, foi observada uma tendência de diminuição no verão, nas concentrações médias de sódio (**142,9 mmol/L**) e potássio (**8,85 mmol/L**) no plasma seminal, período este onde foram identificados resultados superiores na motilidade espermática do sêmen a fresco (**54,9%**). Esses resultados concordam com as conclusões de YUMURA et al. (2002) que altas concentrações de sódio e potássio exercem um efeito deletério na motilidade espermática em homens.

A metodologia utilizada para as dosagens dos componentes bioquímicos foi semelhante à usada por SOUZA (2003), porém os resultados obtidos nesse experimento foram diferentes. Foi observado que as concentrações de potássio, cloretos totais e cálcio, foram menores que as obtidas por SOUZA (2003) e as concentrações de proteínas totais e sódio maiores. Essa diferença pode ser explicada pelas condições de manejo dos animais, pois SOUZA (2003) trabalhou com cães sem raça definida, e antecedentes desconhecidos, enquanto que os animais deste estudo possuíam manejo e nutrição adequados e excelente estado corpóreo.

Na avaliação do perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal foram identificadas um total de 31 bandas, com pesos moleculares entre 139,63 kDa e 2,71 kDa. Esses resultados diferem dos de SOUZA (2003), que identificou 37 bandas com variações entre 100,6 kDa e 3,6 kDa.

Essa diferença pode ser explicada pelo maior número de animais (20

cães) estudado por SOUZA (2003), uma vez que em trabalho de SOUZA & LOPES (2002) com cinco animais foram identificadas apenas 25 bandas no plasma seminal, com densitometria entre 136 kDa e 3,5 kDa; possivelmente o número de bandas varia entre os animais. Provavelmente, se o experimento fosse conduzido com uma amostragem maior, seria identificado um número mais elevado de bandas.

Não foram detectadas variações sazonais no perfil protéico do plasma seminal nos cães estudados, diferente dos resultados obtidos em ovinos por PÉREZ-PÉ et al. (2001).

Uma banda (**31,38 kDa**) do perfil eletroforético do plasma seminal apresentou uma correlação negativa (**r=-0,58**) com temperatura máxima. SOUZA (2003) relatou que após a vasectomia, duas bandas, de 42,6 kDa e 29,2 kDa não foram identificadas no perfil protéico do plasma seminal, sugerindo que estas poderiam ser provenientes da rede de túbulos testiculares.

Considerando a proximidade dos pesos moleculares entre estas bandas (**31,38 kDa** e 29,2 kDa), sugerimos que a banda encontrada nesse estudo pode ser a mesma identificada por SOUZA (2003).

Uma evidência importante nessa correlação seria que a influência negativa da temperatura sobre essa proteína poderia explicar uma diminuição, estatisticamente não significativa, no número de espermatozoides/mL refletida no período posterior às altas temperaturas ( $73,81 \times 10^6$ /mL no verão *versus*  $66,30 \times 10^6$ /mL no outono).

Dentre as bandas identificadas, a de maior densidade óptica foi a

---

banda 19 (**15,29 kDa**). Somente um animal, dos oito estudados, apresentou densitometria baixa desta banda, foi um animal da raça **Golden Retriever**, o qual apresentou resultados superiores na avaliação pós-congelação de sêmen.

SOUZA (2003) identificou no plasma seminal, antes e após a vasectomia, uma banda de peso molecular semelhante (15,6 kDa) com alta densitometria e sugeriu que esta banda pode representar uma das subunidades da arginina esterase, que compõe 90% do total de proteínas do fluido prostático de cães (ISSACS & SHAPER, 1985). A banda encontrada nesse estudo (**15,29 kDa**) pode ser a mesma banda.

Com relação ao cão **Golden Retriever** que apresentou a banda 15,29 kDa com baixa densidade óptica e boa congelabilidade do sêmen, sugere-se que esta banda encontra-se em baixa concentração no plasma seminal deste animal, pois pode estar ligada à membrana espermática, protegendo-a do estresse da criopreservação.

A banda **15,59 kDa** identificada neste estudo apresentou uma correlação positiva ( **$r=0,20$ ,  $r=0,26$  e  $r=0,29$** ; respectivamente) com motilidade espermática pré e pós-congelação, e integridade de membrana pós-descongelção. Apresentou também uma densidade óptica alta e constante durante todo o período experimental, podendo em estudos posteriores ser pesquisada como um possível marcador de fertilidade e ou alta congelabilidade em cães.

Estes resultados complementam os obtidos por SOUZA (2003) que identificou uma correlação positiva entre a densidade óptica das bandas de 67 kDa e de 58,6 kDa e motilidade, vigor, porcentagem de células espermáticas

---

normais e integridade de membrana no sêmen a fresco.

Ficou evidente na literatura consultada a escassez de trabalhos relacionados à sazonalidade reprodutiva na espécie canina. Este fato motivou o início desse projeto, na busca de estabelecer padrões estacionais na função testicular e promover uma melhor utilização deste conceito na reprodução de cães.

Após o término desse experimento ficou claro que existe uma influência do ambiente sobre os aspectos reprodutivos, entretanto, esse efeito é menor do que o esperado, provavelmente, devido à metodologia utilizada.

Acredita-se que interações hormonais entre os metabólitos da testosterona, tiroxina, cortisol e prolactina devam ocorrer, o estudo desses pode proporcionar informações mais seguras a respeito da síntese de hormônios esteróides nas estações.

A avaliação seminal bem como as interações da célula espermática com o plasma seminal sugeriram um efeito da estacionalidade na espermatogênese. Também neste caso, seria interessante a realização de testes mais específicos, como a eletroforese bidimensional. A isoeletrofocalização traria maiores informações das proteínas, para se confirmar as alterações sazonais.

Deve ser considerado que aspectos da domesticação da espécie influenciaram na diminuição dos efeitos da sazonalidade reprodutiva e, acredita-se que somente um conhecimento profundo sobre a fisiologia reprodutiva da espécie canina poderia incrementar os resultados obtidos na criopreservação de gametas, obtenção de embriões e, conseqüentemente no

---

aprimoramento da criação comercial de cães e preservação das espécies ameaçadas de canídeos selvagens.



## *CONCLUSÕES*

## 7. CONCLUSÕES

De posse dos resultados e nas condições desse estudo, pode-se concluir que:

- √ No verão ocorre uma diminuição nas concentrações de testosterona sérica em cães.
  
- √ A sazonalidade não altera os parâmetros seminais pré e pós congelação.
  
- √ A sazonalidade não afeta os volumes prostático e testicular.
  
- √ Altas temperaturas e índice pluviométrico elevado diminuem os níveis de cloretos totais no plasma seminal de cães.
  
- √ Altas temperaturas influenciam de maneira negativa a banda protéica 31,38 kDa do plasma seminal de cães.
  
- √ A função testicular dos cães é pouco influenciada pela sazonalidade.



## *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R.P. Reproductive physiology and endocrinology of the dog. In: MORROW, D.A. **Current therapy in theriogenology**. 2ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986, p.532-38.

ASA, C.S., SEAL, U.S., LETELLIER, M., PLOTKA, E.D., PETERSON, E.K. Pinealectomy or superior cervical ganglionectomy do not alter reproduction in the wolf (*Canis lupus*). **Biology of Reproduction**, v.37, p.14-21, 1987.

BAAS, J.W., MOLAN, P.C., SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.68, n.2, p.275-80, 1983.

BAHGA, C.S., KHOKAR, B.S. Effect of different seasons on concentration of plasma luteinizing hormone and seminal quality vis-à-vis freezability of buffalo bulls (*Bubalus bubalis*). **Int. J. Biometeorol.**, v.35, n.4, p.222-4, 1991.

BARSANTI, J.A., FINCO, D.R. Canine prostatic diseases. In: ETTINGER, S.J. **Textbook of veterinary internal medicine**. 3ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1989, p.340.

BARSANTI, J.A., FINCO, D.R. Moléstias prostáticas no cão. In: ETTINGER SJ. **Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e do gato**. 3.ed., São Paulo:Manole, 1992, p.1941-63.

BARTLETT, D.J. Studies on dog semen. II Biochemical characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.3, p.109-205, 1962.

---

BATEMAN, H.L. **Effects of semen extender composition and cooling methods on canine sperm function and cryo-survival.** Guelph, 2001. 50p. Thesis (master). University of Guelph.

BATTISTA, M., PARKS, J., CONCANNON, P. Canine sperm post-thaw survival following freezing in straws or pellets using PIPES, lactose, Tris or Test extenders. **Anim. Reprod. Sci.**, v.3, p.229-31, 1989.

BELLIN, M.E., HAWKINS, H.E., AX, R. Fertility range of beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. **Journal of Animal Science**, v.72, p.2441-8, 1994.

BERTOK, L., PASZTOR, L. Paper-electrophoretic studies of seminal plasma proteins. **Acta Veterinary Hungary**, v.7, p.439-44, 1957.

BICUDO, S.D. Estudo da estacionalidade reprodutiva em carneiros Ideal: níveis séricos de testosterona, androstenediona, triiodotironina, tiroxina; biometria testicular; avaliação das características do sêmen e de parâmetros indicativos de adaptação ao clima. **Tese de Livre Docência.** FMVZ – UNESP – Campus de Botucatu, 1998, 107p.

BORQUE, M., SAGÜES, A. Variaciones estacionales de los niveles de fructosa, ácido cítrico y proteínas totales en eyaculados de moruecos de raza Manchega. **Invest. Agr. Prod. Sanid. Anim.**, v.7, p.235-9, 1992.

BLACKSHAW, A.W. Temperature and seasonal influences. Chapter 18. In: JOHNSON, A.D., GOMES, W.R. **The testis. Volume IV. Advances in Physiology, Biochemistry and Function.** Academic Press INC, New York, 1977. p. 517-45.

BRANDON C.I., HEUSNER G.L., CAUDLE A.B. et al. Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v.52, p.863-3, 1999.

BRONSON, F.H., HEIDEMAN, P.D. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: KNOBILL, E., NEILL, J.D. (Eds) **The physiology of reproduction**. 2.ed. New York: Raven Press, 1994. p. 541-84.

BRUSCHI, J.H., MENDES, M.C., VIANA, E.S., ABREU, J.J., MEGALE, F. Teores de ácido cítrico, frutose, proteína total e seu fracionamento eletroforético no sêmen do cão pastor alemão normal. **Arquivos da Escola Veterinária UFMG**, v.31, p.13-7, 1979.

CENTOLA, G. M., EBERLY, S. Seasonal variations and age-related changes in human sperm count, motility, motion parameters, morphology, and white blood cell concentration. **Fertility and Sterility**, v.72, n.5, p.803-8, 1999.

CHATTERJEE, S.N., MEENAKSHI, SHARMA, R.N., KAR, A.B. Semen characteristics of normal & vasectomized dogs. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.14, p.411-14, 1976.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

CONCANNON, P.W., BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R. **Current Veterinary Therapy Small Animal Practice**. Philadelphia: W.B. Saunders, p.1247-59, 1989.

CUNHA, I.C.N., LOPES, M.D., ZÚCCARI, C.E.S.N. Padronização da técnica fluorescente para avaliação da integridade de membranas espermáticas na espécie canina. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS

---

VETERINÁRIAS, 15, 1996, Campo Grande. **Resumos...**, Campo Grande, 1996. p.411.

DEPALATIS, L., MOORE, J., FALVO, R.E. Plasma concentrations of testosterone and LH in the male dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.52, p.201-07, 1978.

DUBIEL A. Electrophoretic studies of dog's semen plasma in both fertile and sterile dogs. **Pol. Arch. Weter.**, v. 17, n.4, p.699-706, 1975 (Abstract).

EILTS, B.E., WILLIAMS, D.B., MOSER, E.B. Ultrasonic measurement of canine testis. **Theriogenology**, v.40, p.819-28, 1993.

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl. 47, p.243-55, 1993.

ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II Effects of seminal plasma and blood. **Theriogenology**, v.37, p.373-81, 1992.

EWING, L.L., BERRY, S.J., HIGGINBOTTOM, E.G. Dihydrotestosterone concentration of Beagle prostatic tissue: effect of age and hyperplasia. **Endocrinology**, v.113, p.2004-09, 1983.

FALVO, R.E., DEPALATIS, L.R., MOORE, J., KEPIC, T.A., MILLER, J. Annual variations in plasma levels of testosterone and luteinizing hormone in the laboratory male mongrel dog. **Journal of Endocrinology**, v.86, p.425-30, 1980.

FARSTAD, W. Reproduction in foxes: current research and future challenges. **Animal Reproduction Science**, v.53, p.35-42, 1998.

---

FEENEY, D.A., JOHNSTON, G.R., KLAUSNER, J.S., PERMAN, V., LEININGER, J.R., TOMLINSON, M.J. Canine prostatic disease – comparison of radiographic appearance with morphologic and microbiologic findings: 30 cases (1981-1985). **JAVMA**, v.190, p.1018-26, 1987.

FELDMAN, E.C., NELSON, R.W. Clinical an diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In:\_\_\_\_\_ **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p.673-90.

FELDMAN, E.C., NELSON, R.W. Clinical an diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In:\_\_\_\_\_ **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2004. p.930-52.

FITZGERALD, J. Applied reproductive physiology of the ram. In: YOUNGQUIST, R.S. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997, p.571-4.

FONTBONNE, A., BADINAND, F. Studies on freezing dog spermatozoa. Effect of glycerol on motility after thawing. **Journal of Reproduction and Fertility, Suppl.**, v.47, p.531-32, 1993.

FOOTE, R.H., LEONARD, E.P. The influence of pH, osmotic pressure, glycine, and glycerol on the survival of dog sperm in buffered-yolk extenders. **Cornell Vet.**, v.54, p.78-89, 1964.

FORSBERG, M., FOUIGNER, J.A., HOFMO, P.O., MADEJ, M., EINARSSON, E.J. Photoperiodic regulation of reproduction in the male silver fox (*Vulpes vulpes*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.115-23, 1989.

GOERITZ, F., QUEST, M., WAGENER, A., FASSBENDER, M., BROICH, A., HILDEBRANDT, T.B., HOFMANN, R.R., BLOTTNER, S. Seasonal timing of sperm production in roe deer: interrelationship among changes in ejaculate

---

parameters, morphology and function of testis and accessory glands.

**Theriogenology**, v.59, n.7, p.1487-502, 2003.

GOODMAN, R.L. Seasonal reproduction mammals. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. (Ed). **Encyclopedia of reproduction. Volume IV**. New York: Academic Press, 1999, p.341-51.

GOODROWE, K.L., HAY, M.A., PLATZ, C.C., BEHRNS, S.K., JONES, M.H., WADDELL, W.T. Characteristics of fresh and frozen-thawed red wolf (*Canis rufus*) spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.53, p.299-308, 1998.

GRIFFITHS, K., EATON, C.L., HARPER, M.E., PEELING, B., DAVIES, P. Steroid hormones and the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. **Eur. Urol.**, v.20, p.68-77, 1991.

GROSSE, J., MAYWOOD, E.S., EBLING, F.J.P., HASTING, M.H. Testicular regression in pinealectomized Syrian Hamster following infusions of melatonin delivered on non-circadian schedules. **Biology of Reproduction**, v.49, p.666-74, 1993.

GUNDOGAN M., ELITOK, B. Seasonal changes in reproductive parameters and seminal plasma constituents of rams in Afyon province of Turkey. **Dtsch Tierarztl Wochenschr**, v.111, n.4, p.158-61, 2004.

HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in farm animals**. 5 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987. 649p.

HAMAMAH, S., GATTI, J.L.. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. **Hum. Reprod.**, Suppl 4, p.20-30,1998.

---

HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K., NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology.**, v.11, p.73-88, 1990.

HAY, M.A., KING, W.A., GARTLEY, C.J., LEIBO, S.P., GOODROWE, K.L. Effects of cooling, freezing, and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.51, p.99-108, 1997.

HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.88, p. 343-52, 1990.

HEWITT, D. Fisiology and endocrinology of the male. In: ENGLAND, G.C.W., HARVEY, M. **Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology.** Cheltenham, BSAVA, 1998. p.61.

HOFFMANN, B., LANDECK, A. Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. **Animal Reproduction Science**, v.57, p.89-98, 1999.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.

IGUER-OUADA, M., VERSTEGEN, J. Validation of sperm quality analyser (SQA) for dog semen analysis. **Theriogenology**, v.55, p.1143-58, 2001.

JANETT, F., THUN, R., NIEDERER, K., BURGER, D., HASSIG, M. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. **Theriogenology**, v.60, n.3, p.453-61, 2003.

---

JANETT, F., THUN, R., BETTSCHEN, S., BURGER, D., HASSIG, M. Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches-Montagnes stallions. **Anim. Reprod. Sci.**, v.15, n.77, p.213-21, 2003.

JOBIM, M.I., OBERST, E.R., SALBERGO, C.G., SOUZA, D.O., MATTOS, H.I. Albumina e osteopontina-proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.136-38, 2002.

JOHNSTON, L.A., ARMSTRONG, D.L., BROWN, J.L. Seasonal effects on seminal and endocrine traits in the captive snow leopard (*Panthera uncia*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.102, p.229-36, 1994.

JOHNSTON, S.D. Canine reproduction: lessons in reproductive biology. The 2000 Bartlett Address: A Monograph. Equine Symposium and Annual Conference Society for the Theriogenology. **Proceedings...**, San Antonio, p.2-8, 2000.

JOHNSTON, S.D., KUSTRITZ, M.V.R., OSLOM, P.N.S. Semen collection, evaluation and preservation. In: \_\_\_\_\_. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. cap.16, p.287-306.

KARAGIANNIDIS, A., VARSAKELI, S., ALEXOPOULOS, C., AMARANTIDIS, I. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friensian in Greece. **Small Ruminant Research**, v.37, p. 125-30, 2000a.

KARAGIANNIDIS, A., VARSAKELI, S., KARATZAS, G. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goats bucks born and raised in Greece. **Theriogenology**, v.53, n.6, p.1285-93, 2000b.

---

KREEGER, T.J., SEAL, U.S., COHEN, Y., PLOTKA, E.D., ASA, C.S. Characterization of prolactin secretion in gray wolves (*Canis lupus*). **Canadian Journal of Zoology**, v.69, p.1366-74, 1990.

KILLIAN, G.J., CHAPMAN, D.A., ROGOWISKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1202-7, 1993.

KILLIAN, G.J., CHAPMAN, D.A., CASH, E., GRIEL Jr, I., ALLEN, C.H., GILBERT, G., KAPROTH, M., LENZ, R., MARSHALL, C.E. Conditions which affect the abundance of fertility associated proteins in seminal plasma. **Proceedings...**, 16<sup>th</sup> Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction, p.57-60, 1996.

KÜNZLE, R., MUELLER, M.D., HUBER, A.W., DRESCHER, H., BERSINGER, N.A. Seasonality in human semen quality of smokers and non-smokers: effect of temperature. **Asian Journal of Andrology**, v.6, p.243-47, 2004.

KURODA, H., HIROE, K. Studies on the metabolism of dog spermatozoa. I. Seasonal variation in semen quality and aerobic metabolism of spermatozoa. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v.17, n.3, p.89-98, 1972 (Abstract).

LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. In: **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice. Canine Reproduction**. 1991, p. 467-85.

LOHIYA, N.K., SHARMA, R.S., MANIVANNAN, B., ANAND KUMAR, T.C. Reproductive exocrine and endocrine profiles and their seasonality in male langur monkeys (*Presbytis entellus entellus*). **Journal Med. Primatol**, v.27, n.1, p.15-20, 1998.

---

LOYD, G.H., ENGLUND, J. The reproductive cycle of the red fox in Europe. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement 19, p.119, 1973.

MACCHI, M.M., BRUCE, J.N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 2004 (não impresso).

MALM, G., HAUGEN, T.B., HENRICHSEN, T., BJØRSVIK, C., GROTMOL, T., SÆTHER, T., MALM, J., FIGENSCHAU, Y., HAGMAR, L., RYLANDER, L., LEVINE, R.J., GIWERCMAN, A. Reproductive function during Summer and Winter in Norwegian men living North and South of the Arctic Circle. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.89, n.9, p.4397- 402, 2004.

MARTINS, M.I.M., SOUZA, F.F. de, LOPES, M.D. Eletroforese das proteínas do fluído epididimal canino: Dados preliminares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.72-5, 2002.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial, Inseminação artificial nos cães**. 6.ed. Porto Alegre: Sulina. 1987, 750p.

MOORE, H.D.M., HIBBITT, K.G. The binding of labeled basic proteins by boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.46, p.71-6, 1976.

NAABY-HANSEN, S., FLICKINGER, C.J., HERR, J.C. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.56, p.771-87, 1997.

NÖTHLING, J.O., VOLKMANN, D.H. Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen: A retrospective study. **Journal Small African Veterinary Association**, v.66, p.49-55, 1995.

---

OETTLE, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement 47, p.257-60, 1993.

OLAR, T.T., BOWEN, R.A., PICKETT, B.W. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.31, p.451-61, 1989.

OMU, A.E., AL-BADER, A.A., DASHTI, H., ORIOWO, M.A. Magnesium in human semen: possible role in premature ejaculation. *Archives of Andrology*, v.46, n.1, p.56-66, 2001.

PANDY, V.K., PARMESHWARAN, M., SOMAN, S.D. Concentration of morphologically normal, motile spermatozoa: Mg, Ca and Zn in the semen of fertile men. **Sci Total Environ**, v.27, p.49-52, 1983.

PANGAWKAR, G.R., SHARMA, R.D., BISWAS, R.K., et al. Electrolyte composition of seminal plasma in relation to freezability in Holstein-Friesian bulls. **Indian Journal of Dairy Science**, v.41, n.4, p.497-9, 1988.

PARKS, J.E., GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-22, 1992.

PEÑA, A. **Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelacion-descongelacion**. 1999, p.30-90. Tesis Doctoral - Santiago de Compostela: España.

PEÑA, A., BARRIO, F., QUINTELA, L.A., HERRADÓN, P.G. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrossomal integrity. **Theriogenology**, v.50, p.163-74, 1998.

---

PEÑA, A., LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one or two step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.859-75, 2000.

PEÑA, A.I., LUZ, L.L., BARRIO, M., HERRADÓN, P.G., QUINTQLA, L.A. Effect of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.59, p.1725-39, 2003.

PÉREZ-PÉ, R., BARRIOS, B., MUIÑO-BLANCO, T., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v.760, p.113-21, 2001.

REINBERG, A., SMOLENSKY, M. H., HALLEK, M., SMITH, K.D., STEIMBERGER, E. Annual variation in semen characteristics and plasma hormone levels in men undergoing vasectomy. **Fertility and Sterility**, v.49, p.309-15, 1988. W.B. Saunders, p.571-4.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., EKWALL, H., LINDE-FORSBERG, C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility. Suppl.**, v.47, p.279-85, 1993.

RONCOLETTA, M. **Perfil eletroforético das proteínas de membrana de espermatozóides e plasma seminal, relacionado com a congelabilidade do sêmen de touros**. Jaboticabal, 1999. 154p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

ROTA, A. **Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa**. 1998, p.1-42. Thesis (Doctoral) - Uppsala Sweden: SLU Service/Reprod.

---

ROTA, A., STROM, B., LINDE-FORSBERG, C., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriogenology**, v.47, p.1093-101, 1997.

SAMPER, J.C. Reproductive anatomy and physiology of the breeding stallion. In: YOUNGQUIST, R.S. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997, p.3-12.

SANTOS, T.B., PAPA, F.O., MACEDO, L.P., ALVARENGA, M.A., MELO, C.M., DELL'AQUA JR, J.A. Estudo do efeito da adição de diferentes antibióticos e associações sobre a motilidade e viabilidade espermáticas e inibição do crescimento bacteriano no sêmen congelado eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.357-58, 2003.

SANTOS, S.E.C., VANNUCCHI, C.I., SATZINGER, S.A., ASSUMPÇÃO, M.E.O.D'A., VISINTIN, J.A. Comparison of five extenders for canine semen freezing. **Brazilian Journal of Veterinary Research of Animal Science**, v.36, 1999.

SCHÄFER, S., HOLZMANN, A., ARBEITER, K. The influence of frequent semen collection on the semen quality of beagle – dogs. **Dtsch. Tierärztl. Wschr.**, v.104, p.26-9, 1997.

SHABANOWITZ, R.B., KILLIAN, G.J. Two-dimensional electrophoresis of proteins in principal cells, spermatozoa, and fluid associated with the rat epididymis. **Biology of Reproduction**, v.36, p.753-68, 1987.

SETCHELL, B.P. Male reproduction. In: KING, G.J. **Reproduction in domesticated animals**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1993, p. 82-127.

---

SILVA, L.D.M., ONCLIN, K., LEJEUNE, B., VERSTEGEN, J.P. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. **Veterinary Record**, v.138, p.154-7, 1996.

SORENSEN, M.B., BERGDAHL, I.A., HJOLLUND, N.H., BONDE, J.P.E., STOLTENBERG, M., ERNST, E. Zinc, magnesium and calcium in human seminal fluid: relations to other semen parameters and fertility. **Molecular Human Reproduction**, v.4, n.4, p. 331-7, 1999.

SOUZA, F.F. de. **Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise bioquímica do plasma seminal canino**. Botucatu, 2003. 98p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

SOUZA, F.F. de, LOPES, M.D. Massa molar das proteínas do plasma seminal canino: dados preliminares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.75-7, 2002.

SOUZA, F.F. de, TONIOLLO, G.H., TRINCA, L.A. Avaliação do tamanho prostático de cães normais por meio da ultra-sonografia. **Ars Veterinária**, v.18, n.3, p.204-9, 2002.

SOUZA, J.A.T., SPICCIATI, W., VISINTIN, J.A., BARNABÉ, V.H., BARNABÉ, R.C. Características seminais de cães da raça pastor alemão. **Braz. J. Vet. Res. Sci.**, v.32, n.3, p.181-6, 1995.

TAHA, M.B., NOAKES, D.E., ALLEN, W.E. The effect of season of the year on the characteristics and composition of the dog semen. **Journal of Small Animal Practice**, v.22, p. 177-84, 1981.

TAKEISHI, M., IWAKI, T., ANDO, Y., HASEGAWA, M., TSUNEKANE, T. Studies on reproduction in the dog. VII. Seasonal characters of semen. **Bulletin of**

---

**the College of Agriculture & Veterinary Medicine Nihon University,** n.32, p.224-31, 1975 (Abstract).

THIÉRY, J.C., CHEMINEAU, P., HERNANDEZ, X., MIGAUD, M., MALPAUX, B. Neuroendocrine interactions and seasonality. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.87-100, 2002.

THOMAS, P.G.A., LARSEN, R.E., BURNS, J.M., HAHN, C.N. A comparison of three packing techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. **Theriogenology**, v.40, p.1199-205, 1993.

TULSIANI, D.R.P., YOSHIDA-KOMIYA, H., ARAKI, Y. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. **Biology of Reproduction**, v.57, p.487-94, 1997.

VIANNA, S.A.B., SOUZA, G.V., FAGUNDES, B., FONSECA, C.W., MAEDA, M., GUIMARÃES, M.C., MATTA, M.F.R., MATTA, C.G.F., TILBURG, M.F., SILVA, J.F.S. A influência do plasma seminal na congelabilidade de sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.179-81, 2002.

WALKER, S.L. Aspects of reproductive endocrinology in the red wolf (*Canis rufus*). **Thesis of Master of Science**, University of Ghelph, 1999, p.125.

WATSON, P.F. Artificial insemination and the preservation of semen. In: LAMMING, G.E. (Ed). **Marshall's physiology of reproduction**, 4.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990. v.2, p.747-869.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in cryopreservation of sperm and assessment of their post-thawing function. **Reproduction and Fertility Development**, v.7, p.871-92, 1995.

---

WILLS, J., ROBINSON, I. O companheirismo do animal de estimação e sua evolução. **Unidos para sempre**. Ed. BEAZLEY, M. Octopus Publishing Group Ltda. p.10-23, 2000.

WOODAL, P.F., JOHNSTONE, I.P. Dimensions and allometry of testes, epididymides and spermatozoa in the domestic dog (*Canis familiaris*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.82, p.603-9, 1988.

YANAGIMACHI, R. Mechanisms of fertilization in mammals. In: MASTROIANNI JR, L., BIGGERS, J.D. (Eds). **Fertilization and embryonic development in vitro**. p. 88-182, 1981. Plenum Press, Cambridge , U.K.

YUMURA, Y., SAITO, K., SUZUKI, K., OGAWA, T., KANNO, H., SATO, K., IWASAKI, A., HOSAKA, M. The effect of high concentration of sodium and potassium ion on motility of human sperm preserved in electrolyte-free solution. **Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi**, v.93, n.3, p.440-3, 2002 (Abstract).

MARTINS, M.I.M. **Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães**. Botucatu. 2005. 122p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP.

## RESUMO

Em climas temperados, variações sazonais na reprodução em cães têm sido reportadas, entretanto, em condições tropicais essa influência não tem sido estudada. O objetivo desse trabalho foi avaliar se as modificações ambientais, da Região Sudeste do Brasil, exercem efeitos sobre a função testicular. Neste estudo foram utilizados 8 cães adultos, com idade entre 1,2 a 6 anos, de três raças (1 Blood Hound, 2 Golden Retriever, 4 Springer Spaniel), em atividade reprodutiva, de um mesmo canil, num período de 14 meses. Colheitas de sêmen foram realizadas quinzenalmente. O ejaculado foi imediatamente avaliado quanto à motilidade e vigor espermático, pH, concentração e morfologia dos espermatozoides. Após a centrifugação, o "pellet" foi ressuscitado e submetido a congelamento. No plasma seminal foram determinadas as concentrações de proteínas totais, sódio, potássio, cálcio, magnésio e cloretos totais. A eletroforese SDS-PAGE foi realizada utilizando-se géis de poli(acrilamida) nas concentrações de 12 e 18%. Os géis foram corados com *Coomassie* azul brilhante R-250, as imagens digitalizadas e os pesos moleculares e a densidade óptica integrada estimada. Amostras de sangue foram obtidas a cada 15 dias, sempre no período da manhã, entre 8:30 e 11:30 h. As dosagens séricas de testosterona total foram determinadas por radioimunoensaio (RIA) em fase sólida. Foram realizadas mensurações de próstata e testículos. Os dados referentes às variações de temperatura ambiente (°C) e índice pluviométrico (mm<sup>3</sup>) foram obtidos no CIIAGRO. A variação de temperatura, nesse período, foi de 9°C a 32,8°C, e o índice pluviométrico de 26 mm<sup>3</sup> a 476 mm<sup>3</sup>. A concentração média de testosterona nos animais foi de 131,65 ng/dL a 213,17 ng/dL, com uma grande variação individual. Houve uma queda acentuada no verão de 2003, onde a temperatura e a umidade foram altas. Nas avaliações seminais foi observado um aumento da motilidade espermática no verão. Os resultados na descongelamento e nas mensurações prostáticas e testiculares não variaram no decorrer do período. Houve uma diminuição nas concentrações de cloretos e na densitometria óptica na banda de 31,38 kDa no verão. Diante desses resultados, conclui-se que em regiões tropicais a sazonalidade apresenta uma pequena interferência na função testicular dos cães.

Palavras-chave: Cão; Sazonalidade; Testosterona; Sêmen; Plasma seminal, Eletrólitos; Perfil protéico.

MARTINS, M.I.M. **Seasonality effect on testicular function in dogs.** Botucatu. 2005. 122p. Thesis (PhD in Veterinary Medicine, Animal Reproduction) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP.

### ABSTRACT

In temperate zones, seasonal influence on reproductive performance of male dogs has been described, but in tropical conditions it hasn't been studied. The objective of this work was to evaluate the influence of seasonality on testis function. In the study 8 adult dogs were used, with age varying between 1.2 and 6 years old, from 3 breeds (1 Blood Hound, 2 Golden Retriever, 4 Springer Spaniel). These dogs were active studs, and they were housed in the same kennel, during 14 months. Ejaculates were collected each 15 days. Immediately after the collection, spermatic progressive motility, progressive velocity, pH and sperm morphology, were evaluated. The samples were centrifuged, the pellet re-suspended and frozen, and supernatant was evaluated for total protein, chloride, potassium, sodium, calcium and magnesium. Ultrasonic measurements of canine testis and prostate were performed. Electrophoresis was performed using 12% and 18% SDS-PAGE. The electrophoresis gel was stained with *Coomassie* blue brilliant R-250, scanned and analysed by a software. Molecular weight was estimated based in a standard weight. Blood collections were performed every 15 days at morning (between 8:30 and 11:30 a.m). Testosterone serum concentrations were determined by solid phase RIA (radioimmunoassay). The data from environmental temperature and pluvial index were obtained from CIIAGRO. Testosterone mean concentrations varied from 1.31 ng/mL to 2.02 ng/mL. The temperature varied from 10.2° C to 32.8° C and the pluvial index was 33 mm<sup>3</sup> to 476 mm<sup>3</sup>. Notable individual variation was observed on testosterone serum concentrations among dogs in all seasons. There was a remarkable decrease on testosterone levels in all animals during Summer, when temperature and humidity were high. Seminal parameters before and after thawing were normal during the study. Increase was observed in progressive spermatic motility during Summer. Decrease in chloride concentration and integrated optic density of one band (31.38 kDa) were observed during Summer. In conclusion, in tropical zones, the seasonality has only a minimal influence on canine testicular function.

Keywords: Dog, Seasonal, Testosterone, Semen, Seminal Plasma, Electrophoresis, Electrolytes.