

Fabiana Ferreira de Souza

**Caracterização Eletroforética do Perfil Protéico e
Análise Bioquímica do Plasma Seminal Canino**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Câmpus de Botucatu para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal.

Botucatu – SP

2003

Fabiana Ferreira de Souza

**Caracterização Eletroforética do Perfil Protéico e
Análise Bioquímica do Plasma Seminal Canino**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Câmpus de Botucatu para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal.

Orientadora: **Profa. Dra. Maria Denise Lopes**

Botucatu – SP

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Elza Numata

Souza, Fabiana Ferreira de.

Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise bioquímica do plasma seminal canino / Fabiana Ferreira de Souza. – 2003.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

Orientadora: Maria Denise Lopes

Assunto CAPES: 50504002

1. Cão - Sêmen - Análise

CDD 636.7089261

Palavras-chave: Cão; Plasma seminal; Proteínas; Eletrólitos

DADOS CURRICULARES

Fabiana Ferreira de Souza

NASCIMENTO 08.07.1971 - Ribeirão Preto

FILIAÇÃO Walter Antonio de Souza

Maria Ferreira de Souza

1990/1994 Curso de Graduação em Medicina Veterinária

Faculdade Estadual de Londrina – UEL, Londrina - PR

1995/1996 Programa de Aprimoramento em Medicina Veterinária

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP,
Jaboticabal – SP.

1997/1998 Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área
de Patologia Animal, nível Mestrado

Desde 1995 Inscrita no CRMV, Conselho Regional de Medicina
Veterinária do Estado de São Paulo, sob o nº 9003.

Desde de 2002 Inscrita no EVSSAR, European Veterinary Society on
Small Animal Reproduction.

Dedico

Aos meus pais, Walter e Maria ... sem eles nada teria começado...

Ao João, meu marido ... pelo exemplo de luta, vitórias e pela
amizade...

E aos meus filhos Guilherme e ... pelo amor e pela compreensão
quando a mamãe não pôde estar presente...

Ofereço

A orientadora e amiga Denise
...pela confiança, atenção e dedicação.

Agradeço

Difícil é agradecer e não esquecer de alguém, porém sem o auxílio do próximo, nada somos e nada fazemos.

À Profa. Maria Denise Lopes, que apostou em mim e espero que tenha ganhado. Pela orientação, pelo carinho e amizade.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Reprodução Animal, especialmente ao Valter, a Cris, ao Marquinhos e ao Edilson.

A todos os pós-graduandos do Departamento de Reprodução Animal, pela amizade que é consequência do convívio.

A Profa. Luzia Trinca pela análise estatística e pela amizade.

A todos do Departamento de Física e Biofísica, IB, UNESP, Botucatu, especialmente ao Prof. Paulo, Lurdinha (Magrela), Cilene e Edson, pela paciência, pela ajuda na eletroforese e pela amizade.

A todos do Departamento de Química e Bioquímica, IB, UNESP, Botucatu, especialmente ao Prof. Pedro e ao funcionário Fábio, pelo auxílio durante as dosagens de potássio e sódio.

Ao amigo Marcelo Roncoletta, pois nunca me negou auxílio.

À amiga Tânia, que apesar de distante, sempre esteve aqui ... junto de mim.

Aos meus irmãos Rê, João, Fêr, Alê, Tigô, Pinga, Noar, Márcia, Pedrinho, Simone e João Paraíba, que apesar da “distância” sempre estarão no meu coração.

Ao meu marido João por ter estado (sem reclamações!!) com o Gui, sempre que necessário. Pelos ensinamentos, pela amizade, carinho e pelo exemplo.

Aos animais que emprestaram um momento de suas vidas para que este estudo pudesse ser concluído. E, ainda, a eles pelo carinho doado sem cobranças.

À FAPESP pela concessão da bolsa.

E finalmente ..., acharam que eu fosse esquecer, não é ... às meninas do LAREPE, Bel, Carla, Chris, Jú e Vivi, que por sorte (a minha!), e por gostarmos da área de pequenos (e silvestres) fez com trabalhássemos juntas. Assim uma grande amizade nasceu, e espero que não termine aqui!! Obrigada pela ajuda, em todos os sentidos, pela amizade, pelo carinho, pela compreensão (sei que sou chata às vezes, mas só às vezes, não é!!) pela companhia e ... por tudo ...

... meus mais sinceros, *agradecimentos*.



"Tantas vezes começamos (uma Tese) sonhando com uma vida maravilhosa, selvagem e livre... que geralmente é muito distante da que acabamos levando."

(GREIVE, B.T., 2002)

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Animais	33
4.2. Colheita do Material	33
4.3. Deferentectomia	34
4.4. Avaliação da fertilidade <i>in vitro</i>	35
4.4.1. Análise Macroscópica do Sêmen	35
4.4.2. Análise Microscópica do Sêmen	36
4.5. Análise Bioquímica do Plasma Seminal	39
4.5.1. Proteínas Totais	39
4.5.2. Cloretos Totais	40
4.5.3. Cálcio	40

4.5.4. Potássio	41
4.5.5. Sódio	42
4.5.6. pH	43
4.6. Análise das Proteínas do Plasma Seminal	43
4.7. Análise Estatística	47
5. RESULTADOS	48
5.1. Avaliação da Fertilidade <i>in vitro</i>	48
5.2. Análise Bioquímica do Plasma Seminal	50
5.3. Análise das Proteínas do Plasma Seminal	51
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÕES	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
Resumo	101
Abstract	102

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura1: Médias e desvios padrão das concentrações de proteínas totais (A) e de cloretos totais (B) de amostras do plasma seminal, de 20 cães adultos	56
Figura 2: Médias e desvios padrão das concentrações de cálcio (A) e de potássio (B) de amostras do plasma seminal, de 20 cães adultos	57
Figura 3: Médias e desvios padrão das concentrações de sódio (A) e pH (B) de amostras do plasma seminal, de 20 cães adulto	58
Figura 4: Eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE) à 13% de concentração no gel separador, em sistema descontínuo alcalino de proteínas do plasma seminal canino. Canaleta 1, Marcador de Peso Molecular (Full molecular weight range, 10 a 250 kDa, Amersham Biosciences); setas largas indicam as bandas formadas pelo marcador de peso molecular. Canaletas de 2 a 8 são amostras de plasma seminal canino; setas finas indicam as bandas proteicas B4, de 67 kDa e B5, de 58,6 kDa	64

Figura 5: Eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE) à 22% de concentração no gel separador, em sistema descontínuo de tampão alcalino de proteínas do plasma seminal canino. Canaleta 1, Marcador de Peso Molecular (Low molecular weight range, 2,5 a 45 kDa, Amersham Biosciences); setas largas indicam as bandas formadas pelo marcador de peso molecular. Canaletas de 2 a 8 são amostras de plasma seminal canino; seta fina indica a banda protéica B20, de 15,6kDa

65

Figura 6: Perfil gráfico da densidade óptica (D.O.) das proteínas do plasma seminal antes e após a deferentectomia. Cada pico representa a quantidade de proteína em cada banda, medida pela densidade óptica. A seta indica a banda (B20 de 15,6 kDa) encontrada em maior concentração

66

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Componentes dos géis de separação a 13% e 22% de poliacrilamida para o SDS-PAGE	45
Tabela 2: Componentes do gel de empilhamento numa concentração de 5% de poliacrilamida para o SDS-PAGE	46
Tabela 3: Médias dos parâmetros seminais, volume (VOL), motilidade espermática (MOT), vigor (VIG), concentração espermática total do ejaculado (CONC T), percentagem de espermatozóides morfológicamente normais (N), resultados do teste hiposmótico (HIPO) e percentagem de células íntegras observadas na coloração com sonda fluorescente (FLUOR) no ejaculado de 20 cães adultos	54
Tabela 4: Médias das alterações morfológicas dos espermatozóides de ejaculados de 20 cães adultos. Defeitos maiores, defeitos menores, defeitos de cabeça, defeitos de cauda e defeitos de acrossomo	55

Tabela 5: Densidade óptica integrada (IOD) das bandas protéicas (B) e seus pesos moleculares (PM) de amostras do plasma seminal de 20 cães adultos, antes da deferentectomia, encontradas no gel de separação à 13% (SDS-PAGE) 59

Tabela 6: Densidade óptica integrada (IOD) das bandas protéicas (B) e seus pesos moleculares (PM) de amostras do plasma seminal de 20 cães adultos, antes da deferentectomia, encontradas no gel de separação à 22% (SDS-PAGE) 60

Tabela 7: Densidade óptica integrada (IOD) das bandas protéicas (B) e seus pesos moleculares (PM) de amostras do plasma seminal de 20 cães adultos, após a deferentectomia, encontradas no gel de separação à 13% (SDS-PAGE) 61

Tabela 8: Densidade óptica integrada (IOD) das bandas protéicas (B) e seus pesos moleculares (PM) de amostras do plasma seminal de 20 cães adultos, após a deferentectomia, encontradas no gel de separação à 22% (SDS-PAGE) 62

Tabela 9: Valores do coeficiente de correlação (r) e de p entre as bandas B4 (67 kDa) e B5 (58,6 kDa), considerando as variáveis motilidade espermática, vigor, porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais, resultados do teste hiposmótico e porcentagem de integridade de membrana observada na coloração com sonda fluorescente, de 20 cães adultos

63

I. INTRODUÇÃO

Além de ser uma espécie importante criada pelo homem como animal de estimação e companhia, o cão possui papel fundamental na sociedade. Dentre os animais domésticos, é um dos principais modelos experimentais nas pesquisas conduzidas na área de Medicina, e frente à preocupação mundial com a preservação de espécies, o cão tem sido um modelo valioso para estudos básicos de fisiologia e função reprodutiva aplicadas à população de canídeos silvestres ameaçados de extinção.

Atualmente, a utilização de biotecnologias do sêmen tem sido requisitada, com frequência, pelos criadores de cães. Porém, o uso destes métodos ainda encontra barreiras para o seu sucesso. Vários motivos têm sido associados a resultados negativos. Um deles é o desconhecimento dos componentes específicos do ejaculado, levando ao uso de metodologias empregadas em outras espécies animais. Os cães possuem somente a próstata como glândula sexual acessória, o que é uma particularidade e isto é um fator limitante para a comparação dos elementos do seu ejaculado com os de outras espécies.

A composição e a função dos elementos bioquímicos do plasma seminal do cão não têm sido estudadas, nem tão pouco a correlação com a fertilidade.

A composição protéica do plasma seminal e da membrana espermática tem despertado interesse em muitos pesquisadores. As proteínas têm sido associadas à fertilização, funcionando como elementos chave durante este processo. Algumas são originárias das glândulas sexuais acessórias, principalmente da vesícula seminal, e se ligam ao espermatozóide durante a ejaculação. Outras são adicionadas a membrana espermática durante a formação e maturação destas células. Pesquisadores têm visado a identificação e purificação destas proteínas para o desenvolvimento de aditivos seminais e contraceptivos, além de um método de seleção de indivíduos férteis e inférteis. Nos cães, os aditivos podem ser considerados uma alternativa ao melhor uso do sêmen congelado tanto dos domésticos, como de canídeos silvestres; e os contraceptivos como uma opção no controle populacional dos cães de rua, os quais têm papel importante na transmissão de zoonoses.

Em vista do exposto, levantaram-se as seguintes hipóteses:

- 1) O perfil eletroforético das proteínas e os componentes bioquímicos do plasma seminal de cães se modificam após a deferentectomia?
- 2) Há uma correlação significativa entre a densitometria das bandas protéicas do plasma seminal e a fertilidade *in vitro*? E entre os componentes bioquímicos?

2. OBJETIVOS

Para testar as hipóteses levantadas foram efetuadas as seguintes etapas:

- 1) Avaliação da fertilidade *in vitro* de cães examinando-se as características morfofuncionais do sêmen.
- 2) Caracterização do perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal canino antes e após a deferentectomia.
- 3) Análise bioquímica do plasma seminal canino antes e após a deferentectomia.
- 4) Correlação entre a densitometria das bandas protéicas do plasma seminal de cães e a fertilidade *in vitro*.
- 5) Correlação entre a análise bioquímica do plasma seminal de cães e a fertilidade *in vitro*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Na espécie canina, a utilização de testes *in vivo*, para determinar a fertilidade do sêmen, é limitada. Quando se usa o acasalamento natural, esbarra-se nos longos intervalos entre os ciclos estrais das cadelas, as quais apresentam, em média, dois ciclos por ano, com uma variação de um a quatro ciclos. Além disto, a gestação não altera o intervalo interestral. A indução hormonal do estro fértil, na tentativa de redução do intervalo interestral, ainda não é uma terapia eficiente nessa espécie (JOHNSTON et al., 2001).

Quando a proposta é usar a inseminação artificial, a anatomia vaginal e cervical da cadela são os grandes problemas. A cadela possui um estreitamento da vagina cranial, associado a um canal cervical quase perpendicular ao lume vaginal, dificultando a canulação uterina e conseqüentemente impedindo a deposição intrauterina do sêmen (ROSZEL, 1992). A utilização de catéteres específicos ou endoscópio para a passagem da cérvix requer experiência do operador. A inseminação intrauterina cirúrgica necessita de procedimento anestésico, elevando o custo da técnica, além do risco cirúrgico (FARSTAD, 2000).

Quando se usa sêmen congelado ocorre baixa taxa de gestação e uma diminuição do tamanho da ninhada, em decorrência da

curta sobrevida do sêmen associada à deposição vaginal (OLAR, 1984 apud JOHNSTON et al, 2001).

Desta forma, uma das maneiras mais utilizadas para verificação da fertilidade do sêmen de cães é a avaliação *in vitro*. Os ensaios *in vitro* são capazes de mostrar quais aspectos da função espermática estão alterados. Várias técnicas têm sido descritas para avaliar o sêmen, porém a combinação de diferentes ensaios mostrou resultados mais reais quando comparadas a um único teste, na tentativa de prever a fertilidade *in vivo* (AMANN, 1989, ZHANG et al., 1999).

A principal forma de se avaliar a célula espermática *in vitro* é determinar suas características morfofuncionais. A avaliação da motilidade espermática é a mais comum e pode ser analisada por método subjetivo, utilizando um microscópio de contraste de fase ou, mais recentemente, por programas de computador ("Computer Assisted Semen Analyzer – CASA") (VERSTEGEN et al., 2002). A motilidade progressiva informa sobre uma das características necessárias ao espermatozóide para a fertilização. Apesar disto, a correlação entre a motilidade e a capacidade da célula espermática para fertilizar o ovócito ainda não é totalmente esclarecida e os achados são conflitantes entre os pesquisadores (ENGLAND & ALLEN, 1989, SÖDERQUIST et al., 1991, KJÆSTAD et al., 1993, IVANOVA-KICHEVA et al., 1997, SANCHEZ-PARTIDA et al., 1999, TARDIF et al., 1999). A motilidade tem sido correlacionada positivamente a fertilidade *in vitro*, testada pela penetração

em zona pelúcida de espermatozóides humanos (HOLT et al., 1985, FETTEROLF & ROGERS, 1990).

COETZEE et al. (1998), numa revisão, considera a morfologia espermática como o melhor indicador da fertilidade do macho, pois reflete a competência funcional dos espermatozóides. Estes autores encontraram em 90% dos estudos, em humanos, uma correlação positiva entre a porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais e a fertilidade e/ou gestação; uma correlação positiva também foi verificada com a fertilização *in vitro*, em 81,4% dos artigos revisados.

A morfologia espermática no cão tem sido correlacionada a fertilidade (RENTON et al., 1986, OETTLÉ, 1993). OETTLÉ (1993), relatou uma fertilidade, após a inseminação artificial com sêmen fresco, de 61% para cães com mais de 60% de células espermáticas normais e uma fertilidade de 13% para aqueles com menos de 60% de espermatozóides morfologicamente normais. Porém, ENGLAND & ALLEN (1989), mostraram que cães com baixa qualidade do sêmen poderiam ser férteis usando-se o acasalamento natural.

A concentração espermática foi associada à fertilidade por OEHNINGER et al. (1988) que encontrou aumento significativo na taxa de fertilização *in vitro*, quando usou espermatozóides de homens teratozoospermicos em uma concentração mais elevada.

A integridade da membrana é um método complementar para avaliação morfofuncional da célula espermática. Neste sentido, o

teste hiposmótico e a coloração com sondas fluorescentes são capazes de fornecer resultados eficientes e rápidos sobre as condições da membrana das células espermáticas. A integridade de membrana não é importante somente para o metabolismo espermático, mas também para o sucesso do processo de fertilização. A avaliação da funcionalidade da membrana pode ser usada como um indicador da capacidade de fertilizar do espermatozóide (JEYENDRAN et al., 1984).

O uso do teste hiposmótico tem sido descrito em diversas espécies, principalmente em humanos. É baseado no comportamento do espermatozóide frente a um meio hiposmótico. Na tentativa de equilibrar os meios extra e intracelular, ocorre um influxo de água através da membrana, provocando um edema. Com o edema a cauda se “enrola” e esta alteração é facilmente vista em microscópio de contraste de fase. A capacidade da cauda espermática em se enrolar, devido ao edema provocado pela solução hiposmótica, é um sinal que o transporte de água através da membrana está ocorrendo normalmente, isso significa que a membrana está íntegra e funcional. Acredita-se que a membrana da cabeça tenha o mesmo comportamento que a da cauda, porém estas alterações não são observadas. A capacitação e a fusão entre os gametas estão positivamente correlacionadas aos resultados do teste hiposmótico; assim, estes processos não ocorreriam se a membrana da cabeça não estivesse íntegra (JEYENDRAN et al., 1984).

A coloração com substâncias fluorescentes tem como

objetivo avaliar a integridade estrutural da membrana espermática. Estas colorações avaliam a presença de rupturas como resultado da morte espermática, onde a membrana pode estar fisicamente intacta, até mesmo nas células mortas, mas quimicamente inativa (KUMI-DIAKA e BADTRAM, 1994).

GARNER et al. (1986) descreveram o uso de duas substâncias fluorescentes, o diacetato de 6-carboxifluoresceína e o iodeto de propídeo, para verificar a integridade do espermatozóide de bovinos e outras espécies, onde a contagem dos espermatozóides foi realizada num citômetro de fluxo.

Posteriormente, HARRISON e VICKERS (1990) descreveram a mesma técnica modificada, onde uma pequena quantidade de formaldeído, adicionada à amostra, imobilizava os espermatozóides, possibilitando a contagem em microscópio de fluorescência. O diacetato de 6-carboxifluoresceína é um soluto permeável que é reesterificado dentro da célula espermática, formando um soluto fluorescente impermeável. O iodeto de propídio é impermeável a membrana íntegra, entretanto pode se tornar permeável quando há danos nesta estrutura, penetrando na célula e ligando-se ao DNA. A observação em microscópio de epifluorescência indica as células com membrana íntegra em coloração verde fluorescente (diacetato de 6-carboxifluoresceína) e células com a membrana lesada coradas em vermelho (iodeto de propídio) ou vermelho e verde.

A determinação dos componentes do plasma seminal pode

ser considerada uma forma de avaliação do ejaculado, visto que alguns destes componentes já foram correlacionados a fertilidade (AURICH et al., 1996, RODRIGUES et al., 1999).

O plasma seminal é um meio isotônico, neutro e representa grande interesse bioquímico, por apresentar compostos inorgânicos que não são encontrados em outras partes do organismo, em concentrações tão elevadas (WITE, 1988).

As primeiras análises bioquímicas do ejaculado canino foram realizadas a partir de 1945, quando Huggins e colaboradores, iniciaram estudos comparativos da composição prostática do homem e do cão. Posteriormente, BARTLETT (1962) descreveu valores relacionados ao pH, eletrólitos, proteínas totais, carboidratos e aminoácidos presentes no plasma seminal de cães.

Os elementos bioquímicos do plasma seminal canino têm sido pouco visados e os resultados obtidos são semelhantes entre os estudos já realizados. Segundo BARTLETT (1962), a concentração de sódio do ejaculado canino é de 113,5 mmol/L (113,5 mEq/L) e de cloreto de 152 mmol/L (152 mEq/L). JAMES et al. (1979), estudaram alguns eletrólitos do plasma seminal canino, entre os quais as concentrações de sódio e potássio foram de 141,0 mEq/L e 12,1 mEq/L, respectivamente. De acordo com ENGLAND et al. (1990), na espécie canina os níveis de sódio, potássio e cálcio são de 143,0 mmol/L (143,0 mEq/L), 10,27 mmol/L (10,27 mEq/L) e 0,31 mmol/L (0,31 mg/dL), respectivamente. SOUZA et al. (1995)

encontraram valores médios de 145,32 mEq/L de sódio e de 11,06 mEq/L de potássio.

O conteúdo médio de proteínas totais do plasma seminal canino é de 10,9 mg/mL (1,09 g/dL) (ISAACS et al., 1980). ENGLAND et al.(1990), verificaram que a concentração total de proteína era significativamente maior na segunda fração do ejaculado canino, quando comparada à primeira. Os valores médios encontrados foram de 14,4 g/L (1,44 g/dL) e 42,5 g/L (4,25 g/dL), respectivamente para a primeira e segunda frações. O valor de proteína total observada na terceira fração foi de 30,7 g/L (3,07g/dL).

O plasma seminal, por muitos anos, foi considerado apenas um meio de transporte e sustentação às células espermáticas. Atualmente, estudos adicionando plasma seminal de machos de alta fertilidade às células espermáticas de machos de baixa fertilidade, têm provado a importância desse fluido na fertilidade *in vivo* (AURICH et al., 1996, RODRIGUES et al., 1999).

Quando técnicas de preservação do sêmen são utilizadas, os efeitos do plasma seminal sobre as células espermáticas são deletérios. A tentativa de substituir qualquer tipo de diluente pelo plasma seminal tem revelado estes efeitos negativos na criopreservação. ROTA et al. (1995), verificaram, em cães, uma motilidade espermática de 0% após dois dias de refrigeração utilizando o plasma seminal como meio diluente. HOE et al. (2001) verificaram efeitos semelhantes quando compararam a

sobrevivência de espermatozóides, mantidos à 37°C, utilizando o plasma seminal e o meio diluente “Kenney”, durante período de 24 horas. Estes resultados foram atribuídos a alteração do pH, um dos parâmetros avaliados, o qual se manteve, próximo a neutralidade, no meio diluente.

O plasma seminal apresenta diversos fatores relacionados à inibição da capacitação, conhecidos como fatores de decapacitação. A princípio, acreditava-se que estes fatores tinham um papel prejudicial na fertilização, entretanto, a prevenção da capacitação, até o momento que o espermatozóide encontra o óvulo, é essencial para que a fertilização ocorra. Estes fatores são bem evidentes quando sistemas *in vitro* são utilizados. KANWAR et al. (1979), verificaram inibição na taxa de penetração de espermatozóides humanos, em ovócitos de Hamster desprovidos da zona pelúcida, quando 10% do plasma seminal foram adicionados ao meio de pré-incubação e ao meio no qual realizou-se a inseminação *in vitro*. Quando os espermatozóides foram expostos ao plasma seminal, somente durante e após a inseminação, a penetração dos ovócitos não foi inibida, indicando que o plasma seminal não altera a fusão do espermatozóide com o gameta feminino desde que a reação do acrossomo já tenha ocorrido.

Obviamente, na fertilização *in vivo*, mecanismos previnem o transporte do plasma seminal até o sítio de fertilização (KANWAR et al., 1979) e elementos presentes no microambiente deste local são capazes de auxiliar na remoção desses fatores (MANJUNATH et al., 1993a). KATSKA

et al. (1996), estudando touros, verificaram maior taxa de fertilização, clivagem e desenvolvimento de blastocistos *in vitro* no grupo de animais onde o plasma seminal foi retirado logo após a ejaculação.

Os espermatozóides perdem toda a capacidade de sintetizar e secretar proteínas durante a espermatogênese (SHABANOWITZ & KILLIAN, 1987). Porém, novas proteínas são aderidas pela interação da célula espermática com o meio (NAABY-HANSEN et al., 1997, TULSIANI et al., 1997), incluindo as proteínas presentes no fluido epididimal, no ducto deferente e no plasma seminal, durante a ejaculação. Estas proteínas, adicionadas aos espermatozóides durante a ejaculação, têm sido correlacionadas à fertilidade.

Os primeiros estudos, das proteínas do plasma seminal de mamíferos, foram realizados na década de 50 (LARSON & SALISBURY, 1954). Nesta mesma época, propôs-se a correlação entre os elementos protéicos e a qualidade espermática (BERTOK & PASZTOR, 1957). Atualmente, com o avanço das técnicas de biologia molecular muitas proteínas estão sendo identificadas e caracterizadas (AYYAGARI et al., 1987, FRAZER & BUCCI, 1996, MOREAU & MANJUNATH, 1999).

KILLIAN et al. (1993), utilizando eletroforese bidimensional, encontraram quatro proteínas do plasma seminal associadas à fertilidade de touros. Duas proteínas, 26 kDa (ponto isoelétrico (pI) de 6,2) e 55 kDa (ponto isoelétrico de 4,5), estavam presentes com maior frequência e em maior concentração no plasma seminal de touros com alta fertilidade e

duas, 16 kDa, com pontos isoelétricos (pI) diferentes (pI 4,1 e 6,7), mais proeminentes em touros de baixa fertilidade. Utilizando um modelo de regressão, os autores elaboraram uma equação que permite identificar animais de alta ou baixa fertilidade ($r=0,89$).

Posteriormente, CANCEL et al. (1997) identificaram uma proteína de 55 kDa, pI 4,5, como uma osteopontina e GERENA et al. (1998) identificaram a de 26 kDa, pI 6,2, como uma prostaglandina-D.

As proteínas do plasma seminal podem estar correlacionadas com a congelabilidade do sêmen. RONCOLETTA, (1999) encontrou uma proteína de plasma seminal de 61,8 kDa predominante em touros de alta congelabilidade e ausente nos touros de baixa congelabilidade. Posteriormente, essa proteína foi identificada como um ribonuclease (RONCOLETTA et al., 2002).

Nos eqüinos, BRANDON et al. (1999) verificaram que a SP-1 (72 kDa, pI 5,6), uma proteína do plasma seminal, apresentou uma correlação positiva com a fertilidade, enquanto outras três, a SP-2 (75 kDa, pI 6,0), a SP-3 (18 kDa, pI 4,3) e a SP-4 (16 kDa, pI 6,5) apresentaram uma correlação negativa com a fertilidade. Utilizando-se a técnica de “western blotting”, estes autores demonstraram uma similaridade entre a estrutura da SP-1 e a osteopontina bovina (55 kDa, pI 4,5).

O espermatozóide possui a capacidade de ligar-se a heparina e a moléculas semelhantes, como as glicosaminoglicanas (GAGs) da tuba uterina. Esta ligação tem sido associada a presença de proteínas

do plasma seminal ligadas à superfície espermática, o que leva a modulação da reação do acrossomo induzida pelas glicoproteínas da zona pelúcida (MILLER et al., 1990).

BELLIN et al. (1996) verificaram taxa de gestação 17% maior num grupo de touros que apresentavam proteínas de membrana com maior afinidade a heparina, comparados aqueles com menor afinidade.

As principais proteínas ligadoras de heparina nos bovinos são denominadas BSPs (proteínas do plasma seminal bovino) (CHANDONNET et al., 1990), sendo consideradas as principais proteínas presentes no plasma seminal dessa espécie. Embora não se conheça, totalmente, os passos envolvidos na capacitação e na reação do acrossomo, sabe-se que estas proteínas estão intimamente relacionadas a este processo. As BSPs, são produtos da vesícula seminal que ligam-se ao espermatozóide durante a ejaculação e as GAGs no trato reprodutor feminino (MANJUNATH et al., 1993b). A princípio funcionam como um fator de decapacitação, ligando-se aos fosfolipídios da membrana espermática que contêm o grupo fosfatidil-colina, prevenindo uma reação do acrossomo prematura. No trato reprodutor feminino, este complexo, formado na membrana espermática, liga-se as HDLs (lipoproteínas de alta densidade), o que levará a um seqüestro de colesterol e possivelmente de fosfolipídios. A perda destes lipídios pode resultar numa alteração da permeabilidade da membrana alterada, o que provoca a ativação da Fosfolipase A₂, levando

ao influxo de íons de cálcio. Este processo leva à conversão dos fosfolipídios à lisofosfolipídios, os quais desestabilizam a membrana, resultando na reação do acrossomo (MANJUNATH et al., 1989, CHANDONNET et al., 1990, MANJUNATH et al., 1993a). As BSPs são capazes de ligarem-se a outras proteínas moduladoras da fertilização, tais como a apolipoproteína A-1 (apoA-1), a apoA-1 associada à HDL (MANJUNATH et al., 1989) e a calmodulina (MANJUNATH et al., 1993a).

Proteínas que se ligam a heparina têm sido identificadas em outras espécies, como o equino (FRAZER & BUCCI, 1996, REINERT et al., 1997) e suínos (CALVETE et al., 1996). Uma família das proteínas ligadoras de heparina do equino, as SSPs-7 tem alto grau de identidade com uma proteína presente no plasma seminal canino, a arginina esterase dependente de andrógenos (CALVETE et al., 1995).

No cão pouco se tem estudado sobre a composição protéica do plasma seminal. DUBIEL (1974) e BRUSCHI et al. (1979), baseados em técnicas de eletroforese sob condições não desnaturantes, descreveram três frações protéicas no plasma seminal canino.

STUBBS & RESNICK (1978), estudaram a secreção prostática do cão e descreveram apenas seis bandas protéicas (86 kDa, 73 kDa, 28 kDa, 25 kDa, 19 kDa e 16 kDa), sendo a de 86 kDa presente em animais castrados. FRENETTE et al. (1985) estudaram as proteínas do líquido prostático canino verificaram uma produção elevada de arginina esterase pela glândula prostática, um possível marcador deste tecido.

A arginina esterase é uma enzima proteolítica, também conhecida como esterase específica prostática canina (CPSE), que compõe 90% do total de proteínas contidas no fluido prostático canino. Sob condições não desnaturantes, seu peso molecular é de, aproximadamente, 30 kDa e sob condições desnaturantes, forma duas subunidades, determinadas de H, de 15 kDa, e subunidade L, de 12 a 14 kDa (ISAACS & SHAPER, 1985, McENTEE et al., 1987).

SOUZA & LOPES (2002), utilizando gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) sob condições desnaturantes encontraram 25 bandas, com pesos moleculares variando de 136kDa a 3.5kDa, em cães de fertilidade desconhecida (n=5).

MARTINS et al. (2002), estudando o perfil protéico do fluido epididimal canino, encontraram um padrão semelhante ao verificado no plasma seminal.

Proteínas da membrana espermática também têm sido correlacionadas com fertilidade. No cão, SAUBEUR et al. (2002), identificaram a PH-20, uma proteína localizada na região da cabeça de células com acrossomo intacto, com atividade semelhante a hialuronidase, e que, possivelmente está envolvida no processo de fertilização. Sua função foi relacionada a penetração das células do *cumulus* e ligação a zona pelúcia, como já descrito em outras espécies (GMACHL et al., 1993, MEYERS et al., 1997).

PRIMAKOFF et al. (1997), obtiveram sucesso na indução

de infertilidade reversível em cobaios machos, imunizados com a PH-20; estes resultados são promissores já que a proteína foi detectada no cão e poderia funcionar como um método de imun contracepção.

A deferentectomia é um procedimento cirúrgico simples que possibilita a oclusão da passagem dos espermatozoides através dos ductos deferentes até o meio exterior ou trato reprodutivo da fêmea (MANN & MANN, 1981). No cão, os espermatozoides desaparecem do ejaculado entre 2 a 21 dias após o procedimento (SILVA et al., 1993). A princípio acreditava-se que a deferentectomia produziria uma diminuição permanente do tecido espermatogênico, com uma hipertrofia compensatória do tecido intersticial (STEINACH, 1920 apud MANN & MANN, 1981). Estes achados levaram a conclusão que a deferentectomia provocava um efeito estimulatório na atividade androgênica do testículo (MANN & MANN, 1981).

MANN (1956) apud MANN & MANN (1981) encontraram altos níveis de frutose e ácido cítrico no ejaculado de touros e carneiros deferentectomizados e concluíram que a deferentectomia elevava os níveis desses açúcares em decorrência de um aumento da atividade andrógeno-dependente da vesícula seminal. PIERREPOINT et al. (1975) ressaltaram que embora as concentrações destes açúcares se elevem após a deferentectomia, a influência androgênica, muitas vezes, está reduzida e os espermatozoides que catabolizariam os açúcares do plasma seminal não estão mais presentes.

No homem, NAIK et al. (1976) demonstraram que nenhuma alteração ocorre nos níveis de testosterona, LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo estimulante) após a deferentectomia. Porém, KINSON et al. (1977), ressaltou uma elevação temporária nos níveis de testosterona plasmática após a deferentectomia de ratos, mas nenhuma alteração significativa foi observada em períodos prolongados após a cirurgia.

Muitos experimentos, em diferentes espécies animais, têm demonstrado que a deferentectomia pode levar a distúrbios do epitélio germinativo, porém não de forma permanente (MANN & MANN, 1981). Atualmente, sabe-se que no homem a deferentectomia não altera o tecido testicular (WEISKE, 2001), porém em animais ocorre uma alteração severa a atrofia do tecido (AYDOS et al., 1998). Nos cães, KOTHARI & MISHRA (1973) e VARE & BANSAL (1973) encontraram marcada degeneração do epitélio seminífero com a interrupção da espermatogênese, após o procedimento cirúrgico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ejaculados de 20 cães adultos, sem raça definida, pesando entre 15 e 20 Kg, provenientes do Canil do Biotério Central do Câmpus de Botucatu, UNESP. Foram utilizados apenas cães com sorologia negativa para leptospirose e brucelose canina. Antes do início do experimento, os cães foram avaliados clinicamente, desverminados e treinados para a colheita do sêmen. Os machos foram alojados em grupos, contendo no máximo três cães em cada canil (3,5 x 2,5 m) destinado aos experimentos dos alunos de pós-graduação, do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Botucatu. Os cães foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

4.2. Colheita do Material

O sêmen foi colhido por manipulação digital do pênis na ausência de uma fêmea em estro (SEAGER & PLATZ, 1977). Após o período de adaptação e condicionamento, os animais foram submetidos a três colheitas de sêmen com intervalos de 48 horas entre cada uma. Após a deferentectomia foi dado um intervalo de 15 dias para que então quatro

outros ejaculados fossem colhidos, sendo o primeiro deles descartado e colhido apenas para verificar a ausência dos espermatozóides. Somando-se o período de adaptação, período experimental antes e após a deferentectomia mais de 250 amostras foram colhidas, sendo que 120 foram incluídas no experimento.

O sêmen foi colhido em tubos plásticos de 15 mL, acoplados a funis plásticos, previamente aquecidos. Apenas a segunda e parte da terceira frações foram colhidas. Após a colheita, o sêmen foi imediatamente transportado do canil experimental ao laboratório. Cada ejaculado foi analisado no prazo máximo de 15 minutos após a colheita, segundo as suas características macro e microscópicas. Após a análise, o plasma seminal foi separado dos espermatozóides por centrifugação a 800xg (**Excelsa Baby II, Fanem, modelo 206-R, Brasil**), durante 10 minutos. Uma segunda centrifugação foi realizada a 4200xg, durante 1 hora, a 4° C (**MLW, modelo K-23, Alemanha**) para garantir a ausência de espermatozóides no sobrenadante. O plasma seminal foi então separado em duas amostras, uma para realização da eletroforese e outra para as dosagens bioquímicas e ambas congeladas a – 20° C.

4.3. Deferentectomia

A deferentectomia foi realizada nos 20 cães utilizando os protocolos anestésicos de rotina da área de anestesiologia do Hospital Veterinário, FMVZ, UNESP, Botucatu - SP. Após anestesia, tricotomia da

região pré-escrotal e anti-sepsia, os cães foram acomodados em decúbito dorsal. Uma incisão da pele e tecido subcutâneo, de 2,0 a 3,0 cm, foi realizada na linha média da região pré-escrotal. Após o isolamento do ducto deferente foram feitas duas ligaduras com fio de Nylon 4-0 de aproximadamente 1,0 cm de distância entre uma e outra. Então, o ducto deferente foi seccionado e a túnica vaginal suturada com Categut 4-0. O mesmo procedimento foi realizado no ducto deferente contralateral. O tecido subcutâneo foi reaproximado com Categut 2-0 e a pele suturada com Nylon 4-0. Uma aplicação de Penicilina G-Benzatina (**40.000 UI/Kg, SC**) foi realizada imediatamente após o procedimento cirúrgico. No pós-operatório foram realizados curativos diários com iodo povidine. A sutura foi retirada 10 dias após a cirurgia.

4.4. Avaliação da Fertilidade *in vitro*

4.4.1. Análise Macroscópica do Sêmen

O volume foi determinado pela graduação do tubo plástico utilizado na colheita em mL.

A cor foi determinada pela visualização direta, considerando a cor branco opalescente como normal. Amostras com colorações alteradas foram eliminadas após a investigação do material contaminante.

4.4.2. Análise Microscópica do Sêmen

A análise microscópica do sêmen foi baseada na motilidade, vigor, concentração espermática, teste hiposmótico e teste com sondas fluorescentes.

A motilidade e o vigor foram determinados com uma gota de sêmen colocada sobre lâmina aquecida (38–40°C) e recoberta por lamínula. O exame foi realizado pela observação do movimento das células espermáticas, utilizando um microscópio de contraste de fase (**Carl Zeiss, Jena, Alemanha**), num aumento de 10X. A motilidade representou a porcentagem (0 a 100%) de espermatozóides com movimento; o vigor espermático foi representado por um escore de 0 a 5, onde 0 representou espermatozóides sem movimento e 5 espermatozóides com movimentos rápidos e vigorosos.

A concentração espermática foi realizada em câmara hematóimétrica de “Neubauer” após a diluição do sêmen total na proporção de 1: 20 em água destilada. Os espermatozóides foram contados sob microscópio de contraste de fase, num aumento de 20X e o número de células foi expresso em mL.

A morfologia espermática foi avaliada após a confecção de esfregaços do sêmen, fixados em solução salina aquecida à 37°C, durante 10 minutos e corados pelo método de KARRAS modificado (PAPA et al, 1986). Foram avaliadas 200 células de cada cão e os resultados expressos em porcentagem de células morfologicamente normais, defeitos maiores e

menores, segundo BLOM (1972).

O teste hiposmótico foi realizado segundo a técnica descrita por JEYENDRAN et al. (1984), que consiste em misturar 0,1 mL do sêmen com 0,9 mL da solução hiposmótica de 150 mOsmol **(7,35 g citrato de sódio.2 H₂O, 13,51 g frutose em 1000 mL de água destilada e a osmolaridade verificada em osmômetro após o preparo)**. Uma solução isosmótica de 300 mOsmol **(14,7 g citrato de sódio.2 H₂O, 27,02 g frutose em 1000 mL de água destilada e a osmolaridade verificada em osmômetro após o preparo)** foi utilizada como controle de acordo com INAMASSU et al. (1999). O material foi incubado à 37°C, durante 30 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram agitadas por movimentos de inversão e uma gota do material foi colocada em uma lâmina de vidro, recoberta por uma lamínula e a leitura realizada sob microscópio de contraste de fase. Foram contadas 200 células espermáticas, em vários campos da lâmina, escolhidos aleatoriamente. Na solução hiposmótica foram considerados espermatozóides com integridade estrutural e funcional da membrana, aqueles que apresentavam edema, evidenciado pelo enrolamento da cauda. A solução isosmótica serviu como controle para descartar os espermatozóides que apresentavam cauda enrolada antes do teste. O resultado foi dado em porcentagem onde o valor obtido da quantidade de espermatozóides com a cauda enrolada, na solução isosmótica, foi subtraído da porcentagem de espermatozóides com a cauda enrolada na solução hiposmótica, ou seja:

TH% = % sptzs hipo - % sptzs iso, onde,

TH% foi o resultado do teste hiposmótico em porcentagem de espermatozóides com integridade de membrana;

% sptzs hipo foi a porcentagem de espermatozóides com a cauda enrolada na solução hiposmótica;]

% sptzs iso foi a porcentagem de espermatozóides com a cauda enrolada na solução isosmótica.

A coloração com sondas fluorescentes foi realizada de acordo com a técnica descrita por HARRISON & VICKERS (1990), adaptada ao cão por CUNHA et al. (1996). As soluções estoques de diacetato de 6-carboxifluoresceína (**9,2 mg diacetato de 6-carboxifluoresceína em 20 mL dimetilsulfóxido (DMSO)**), iodeto de propídeo (**10 mg de iodeto de propídeo em 20 mL solução fisiológica**), formaldeído (**diluição de 1: 80 de formalina à 40% em solução fisiológica**) e citrato de sódio a 3% (**3,0 g de citrato de sódio em 100 mL de solução fisiológica**) foram preparadas. Uma fração de 10 µl de sêmen foi diluída em 40 µl da solução trabalho (**20 µl da solução estoque de diacetato de 6-carboxifluoresceína, 10 µL da solução estoque de iodeto de propídeo, 10 µl solução estoque de formaldeído e 960 µl de citrato à 3%**), preparada no momento do uso. Uma gota do material foi depositado em uma lâmina de vidro, recoberta por lamínula e analisada em microscópio de epifluorescência (**Olympus, BX60, USA**) num aumento de 100X (imersão), com filtro WG. Foram contadas 200 células, onde as com

coloração verde fluorescente foram consideradas de membrana íntegra e as vermelhas ou vermelhas e verdes consideradas lesadas.

4.5. Análise Bioquímica do Plasma Seminal

4.5.1. Proteínas Totais

As concentrações de proteínas totais do plasma seminal foram determinadas, em duplicata, pelo método colorimétrico do Biureto (**Analisa Diagnóstica, Brasil**), segundo as instruções do fabricante. Neste método, as ligações peptídicas das proteínas (-HN-CO-) reagem com íons cúpricos em meio alcalino (reagente do Biureto) formando um complexo de coloração violeta, cuja absorbância é diretamente proporcional a concentração de proteínas na amostra. Para o teste, foram adicionados 20 µL da amostra à 1,0 mL da solução trabalho (**hidróxido de sódio 1,86 mol/L, tartarato de sódio e potássio 430 mmol/L, sulfato de cobre 120 mmol/L e iodeto de potássio 300 mmol/L**). O espectrofotômetro (**Compu-Espectro B385, Micronal**) foi calibrado com o tubo branco (**20 µL de água destilada e 1,0 mL da solução trabalho**) e os cálculos foram baseados num padrão de proteínas totais (**20 µL do padrão à 4 g/dL e 1,0 mL da solução trabalho**) após a leitura num comprimento de onda de 545 nm. Os valores foram expressos em g/dL.

4.5.2. Cloretos Totais

As concentrações de cloretos totais do plasma seminal

foram determinadas, em duplicata, pelo método colorimétrico do Tiocianato **(Analisa Diagnóstica, Brasil)**, segundo as instruções do fabricante. O método é baseado na reação dos íons cloretos com o tiocianato de mercúrio formando cloreto de mercúrio e íons tiocianato, que reagem com os íons férricos formando tiocianato férrico. O tiocianato férrico possui cor amarela o que determina a concentração de cloretos na amostra. Para o teste, foram adicionados 10 µL da amostra à 100 µL do ativador **(nitrato de mercúrio 2 mmol/L e ácido nítrico 0,9 mmol/L)** e 1,0 mL do reagente de cor **(tiocianato de mercúrio 2 mmol/L, nitrato férrico 17 mmol/L e ácido nítrico 30 mmol/L)**. O espectrofotômetro **(Compu-Espectro B385, Micronal)** foi calibrado com o branco **(10 µL de água destilada, 100 µL do ativador e 1,0 mL do reagente de Cor)** e os cálculos foram baseados num padrão de cloretos **(10 µL do padrão à 100 mEq/L, 100 µL do ativador e 1,0 mL do reagente de cor)** após a leitura num comprimento de onda de 470 nm. Os valores foram expressos em mEq/L.

4.5.3. Cálcio

As concentrações de cálcio do plasma seminal foram determinadas, em duplicata, pelo método colorimétrico da cresolftaleína complexona **(Analisa Diagnóstica, Brasil)**, segundo as instruções do fabricante. O método é baseado na reação do cálcio com a orto-cresolftaleína complexona (púrpura de ftaleína) em meio alcalino, formando um complexo de cor violeta, cuja absorbância é diretamente proporcional à

sua concentração. Dois mL da solução trabalho, que continha volumes iguais de tampão **(2-amino 2-metil 1-propanol 0,5 mol/L em metanol 35% v/v, pH 11,0 e surfactante)** e reagente de cor **(orto-cresolftaleína complexona 0,130 $\mu\text{mol/L}$, 8-hidroxiquinoleína e ácido clorídrico 250 mmol/L)** foram adicionados ao tubo teste. Uma primeira leitura foi realizada em espectrofotômetro **(Ultrospec 2000, Amersham Bioscience, Suécia)**, num comprimento de onda de 570 nm para a calibração do aparelho. Então, foram adicionados aos 2,0 mL da solução trabalho, 20 μL da amostra e realizada uma segunda leitura. Os cálculos foram baseados num padrão **(20 μL do padrão a 10 mg/dL em 2,0 mL da solução trabalho)**. Os valores foram expressos em mg/dL.

4.5.4. Potássio

As concentrações de potássio do plasma seminal foram determinadas após diluição da amostra em água destilada na proporção de 1: 1.000, no Departamento de Química, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP. O aparelho foi calibrado com água destilada e a leitura foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica **(Varian, Intralab, modelo AA-1475, USA)** num comprimento de onda de 766,5 nm. Uma curva de referência ($r = 0,99$), a partir de diversas concentrações conhecidas de potássio **(0,3 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L e 1,5 mg/L)** foi feita, a qual permitiu a confecção de uma equação, onde foi possível determinar os valores das concentrações de potássio das amostras,

baseadas em duas leituras do aparelho. Os valores foram expressos em mEq/L.

4.5.5. Sódio

As concentrações de sódio do plasma seminal foram determinadas após diluição da amostra em água destilada na proporção de 1: 10.000, no Departamento de Química, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP. O aparelho foi calibrado com água destilada e a leitura foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica (**Varian, Intralab, modelo AA-1475, USA**) num comprimento de onda de 589 nm. Uma curva de referência ($r= 0,99$), a partir de diversas concentrações conhecidas de sódio (**0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,4 mg/L e 0,6 mg/L**) foi feita, a qual permitiu a confecção de uma equação, onde foi possível determinar os valores das concentrações de sódio das amostras, baseadas em duas leituras do aparelho. Os valores foram expressos em mEq/L.

4.5.6. pH

O pH foi determinado utilizando-se fitas colorimétricas com uma variação de 4,0 a 10,0 (**Merck KGaA, Alemanha**).

4.6. Análise das Proteínas do Plasma Seminal

A eletroforese foi realizada conforme descrito por LAEMMLI (1970) e adaptado por BOLLAG et al. (1996), utilizando-se duas concentrações de poliacrilamida (**29,2% de Acrilamida e 0,8% de Bisacrilamida**), de 13% e 22%, nos géis de separação para cada amostra.

As corridas eletroforéticas foram realizadas em mini cubas verticais (**Hoefer MiniVE Vertical Electrophoresis System - Amersham Biosciences**). Após a limpeza das placas de vidro com álcool etílico 96°, as mesmas foram montadas sobre o suporte da cuba.

Os géis de separação a 13% e 22% foram preparados, conforme descrito na Tabela 1, e depositados entre as placas de vidro, com auxílio de uma pipeta plástica descartável de 10 mL. Uma pequena quantidade de água MilliQ (no máximo 2 mL) foi depositada sobre o gel para impedir o contato com o ar, possibilitando uma superfície mais homogênea. Um período de 15 a 30 minutos foi aguardado para que a polimerização do gel ocorresse. Durante este intervalo, as amostras foram diluídas em água MilliQ, numa concentração final de 2 µg/µL (para o gel a 22%) e 5 µg/µL (para o gel a 13%) de proteína total e misturadas ao tampão da amostra (**TRIS-HCl 60 mM, pH 6,8, glicerol 50%, SDS 2%, 2-**

mercapetanol 23 mM, 0,1% bromofenol azul em água MilliQ), na proporção de 1 de tampão para 4 de amostra e homogeneizadas no agitador de tubos (**Multimixer, Biomixer, modelo MVS-1, Brasil**). Então, foram fervidas, em torno de 100°C, durante 7 minutos.

O gel de empilhamento a 5% foi preparado, conforme descrito na Tabela 2, e colocado sobre os géis de separação já polimerizados, após a absorção da água com um papel de filtro. 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. Após a polimerização do gel de empilhamento, o molde foi retirado e os suportes contendo as placas foram colocados na cuba de corrida. O tampão de corrida (**TRIS 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% em água MilliQ**), já diluído na proporção de 1 de tampão para 4 de água, foi adicionado às cubas.

A quantidade total de proteína aplicada em cada canaleta foi de 80 µg em 20 µL e de 16 µg em 10 µL, nos géis de separação a 13% e 22%, respectivamente. Uma canaleta em cada gel foi destinada a aplicação de um padrão de proteínas de alto (**Full Range Rainbow, Recombinant Protein Molecular Weight Markers, 10 a 250 kDa, Amersham Biosciences**) e baixo (**Rainbow Coloured Protein Molecular Weight Markers, 2.5 a 45 kDa, Amersham Biosciences**) peso molecular, respectivamente para os géis de separação à 13% e 22%. A cuba foi então ligada a uma fonte elétrica bipolar (**EPS 300 Power Supply, Amersham**

Biosciences) com uma corrente elétrica constante de 25 mA e voltagem máxima de 184 V/ 3h e 250 V/ 5h, respectivamente para os géis de separação à 13% e 22%.

Tabela 1: Componentes dos géis de separação a 13% e 22% de poliacrilamida para o SDS-PAGE.

Concentração de Poliacrilamida	13%	22%
Solução A (30% de acrilamida e 0,8% de bis-acrilamida)	6,5 mL	11 mL
Solução B (TRIS-HCl 1,5M, pH 8,8, 0,4% SDS em água MilliQ)	3,75 mL	3,75 mL
Água MilliQ	4,75 mL	225 µL
Persulfato de amônia 10%	100 µL	100 µL
TEMED	15 µL	15 µL
VOLUME TOTAL	15 mL	15 mL

Após a corrida eletroforética, os géis foram retirados das placas de vidro e colocados num recipiente plástico onde foram 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, em torno de 50°C no microondas (**CCE, Brasil**), por 30 minutos e uma hora para os géis de separação à 22% e 13%, respectivamente, sob constante agitação (**Rotary Shaker, Biomixer, modelo MOS-1, Brasil**). Os géis foram descorados por duas vezes,

* RAMOS, P.R.R. Instituto de Biociências, UNESP, Campus Botucatu, CEP 18618-000. Comunicação Pessoal.

durante 15 minutos em uma solução descorante (**100 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial e 800 mL de água MilliQ**) aquecida (**50°C, 30 segundos no microondas**), sob constante agitação. Nova descoloração foi realizada em água destilada, por 20 minutos, no microondas potência 70W e por 10 minutos potência 100W. Os géis foram armazenados em vasilhas plásticas, em água destilada contendo 5% de glicerol, numa temperatura de 4°C.

Tabela 2: Componentes do gel de empilhamento numa concentração de 5% de poliacrilamida para o SDS-PAGE.

Concentração de Poliacrilamida	5%
Solução A (30% de acrilamida e 0,8% de bis-acrilamida)	0,67 mL
Solução C (TRIS-HCl 0,5 M, pH 6,8, 0,4% SDS em água MilliQ)	1,0 mL
Água MilliQ	2,3 mL
Persulfato de amônia 10%	30 µL
TEMED	5 µL
VOLUME TOTAL	4,0 mL

Posteriormente, as imagens dos géis foram digitalizadas (**VDS, Amersham Biosciences**) e um “software” analisador de imagens (**Image Master, Amersham Biosciences**), do Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, foi utilizado para determinar o peso molecular e a densidade óptica integrada (IOD) para cada banda, de cada amostra no gel.

Os géis foram montados entre papel celofane permeável com gelatina incolor, sobre uma placa de vidro.

4.7. Análise Estatística

A análise de variância, usando o animal como bloco foi utilizada para verificar as diferenças entre os parâmetros seminais nas três colheitas de cada cão e a concentração dos eletrólitos e proteínas totais antes e após a deferentectomia.

O teste t pareado, para dados com distribuição normal, foi utilizado para verificar as diferenças entre a densitometria das bandas encontradas na eletroforese. Para a densitometria das bandas que não apresentaram distribuição normal foi usada a análise de Wilcoxon (ZAR, 1999).

Os cálculos destas análises foram realizados no programa SAS (**Statistical Analysis System, v.6.12, 1996**).

Para a análise de regressão e determinação do coeficiente de correlação (r), entre os parâmetros obtidos da análise do sêmen, a densitometria das bandas encontradas na eletroforese e a concentração de eletrólitos e proteínas totais foi utilizado o programa Excel (**v. 6.0, 1997**).

Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

O período de adaptação dos cães e condicionamento às colheitas foi em média de três semanas. O experimento iniciou-se quando três colheitas de sêmen seguidas apresentaram um padrão semelhante. Os cães com sorologia positiva para leptospirose e/ou brucelose canina, agressivos ou que não se condicionaram à colheita do sêmen foram eliminados do estudo.

5.1. Avaliação da Fertilidade *in vitro*

Para os três ejaculados colhidos antes e após a deferentectomia utilizou-se uma média, visto que não foram encontradas diferenças significativas entre os dados analisados de um mesmo cão, nas três colheitas, devido à padronização desejada. Os resultados médios obtidos nas três colheitas de sêmen, antes da deferentectomia, estão representados na Tabela 3. A Tabela 4 representa a porcentagem média dos defeitos maiores, defeitos menores, defeitos de cabeça espermática, defeitos de cauda espermática e defeitos de acrossomo. Quatro cães (nº 3, 6, 9 e 12) apresentaram as médias dos parâmetros seminais abaixo dos recomendados para a espécie (SEAGER & PLATZ, 1977).

Os resultados do teste hiposmótico correlacionaram-se

positivamente a motilidade espermática ($r = 0,96$, $p < 0,0001$), o vigor espermático ($r = 0,87$, $p < 0,0001$) e a porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais ($r = 0,87$, $p < 0,0001$); e negativamente aos defeitos de cauda espermática ($r = -0,84$, $p < 0,0001$).

A porcentagem de células íntegras observadas na coloração com sondas fluorescentes correlacionou-se positivamente a motilidade espermática ($r = 0,92$, $p < 0,0001$), o vigor espermático ($r = 0,84$, $p < 0,0001$) e a porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais ($r = 0,83$, $p < 0,0001$); e negativamente aos defeitos de cabeça ($r = -0,41$, $p = 0,04$) e defeitos de cauda espermática ($r = 0,86$, $p < 0,0001$).

Não houve diferença estatística significativa entre os resultados do teste hiposmótico e a porcentagem de células íntegras observadas na coloração com sondas fluorescentes ($p = 0,36$).

5.2. Análise Bioquímica do Plasma Seminal

As concentrações médias dos componentes bioquímicos determinados no plasma seminal dos 20 cães estudados, antes e após a deferentectomia, estão representadas na Figura 1,2 e 3.

Os valores médios encontrados para proteína total (g/dL), cloretos totais (mEq/L), cálcio (mg/dL), potássio (mEq/L), sódio (mEq/L) e pH, antes e após a deferentectomia foram de 2,19 e 2,32 g/dL, 180,18 e 187,46 mEq/L, 0,80 e 0,91 mg/dL, 11,76 e 12,48 mEq/L, 146,93 e 156,61 mEq/L, 6,67 e 6,78, respectivamente.

Apenas o potássio correlacionou-se negativamente a motilidade espermática ($r = -0,49$, $p = 0,027$), ao vigor espermático ($r = -0,60$, $p = 0,0053$), aos resultados do teste hiposmótico ($r = -0,50$, $p = 0,026$) e a porcentagem de células íntegras observadas na coloração com sondas fluorescentes ($r = -0,45$, $p = 0,046$).

O cálcio apresentou-se, significativamente, mais elevado ($p = 0,037$) após a deferentectomia. Os outros componentes bioquímicos analisados não se alteraram após o procedimento cirúrgico.

5.3. Análise das Proteínas do Plasma Seminal

Foi verificado um total de 37 bandas antes e 35 após a deferentectomia. As bandas B9 (42,6 kDa) e B13 (29,2 kDa) não estavam presentes nas amostras de plasma seminal dos cães estudados após a deferentectomia.

No gel a 13% foram verificadas 19 bandas antes da deferentectomia e 17 bandas após (Tabelas 5 e 7, Figura 4). Os pesos moleculares variaram entre 100,6 kDa e 17,1 kDa, sendo que apenas 4 bandas (**49,7 kDa, 33,2 kDa, 26,4 kDa e 19,5 kDa**) estavam presentes em todos os cães antes da deferentectomia e 3 bandas (**49,7 kDa, 33,2 kDa e 26,4 kDa**) após.

No gel a 22%, 18 bandas estavam presentes (Tabelas 6 e 8, Figura 5), com pesos moleculares variando entre 15,6 kDa e 3,6 kDa sendo 9 comuns (**15,6 kDa, 13,5 kDa, 12,7 kDa, 11,7 kDa, 10,5 kDa, 8,7**

kDa, 7,8 kDa, 5,6 kDa e 4,9 kDa) a todos os cães antes e após a deferentectomia.

A Figura 6 representa o perfil gráfico das proteínas de amostras do plasma seminal antes e após a deferentectomia, encontradas nos 20 cães estudados. Aproximadamente, 85% das bandas possuíam peso molecular abaixo de 15 kDa, sendo que deste total, aproximadamente, 27% era a banda B20, de 15,6 kDa (Figura 6).

Pela análise de regressão foi possível verificar uma correlação positiva entre a densitometria de duas bandas (**B4 de 67 kDa e B5 de 58,6kDa**) (Figura 4) do plasma seminal e a fertilidade *in vitro* determinada pelos parâmetros seminais, cujos valores de **r** e de **p** estão descritos na Tabela 9.

A densitometria da banda B3, de 73,5 kDa encontrou-se significativamente (**p= 0,030**) mais elevada antes da deferentectomia. Enquanto as IODs das bandas B29, de 7,8 kDa (**p= 0,026**) e B37, de 3,6 kDa (**p= 0,047**) foram significativamente mais elevadas após a deferentectomia.

Quinze dias após a deferentectomia, a primeira colheita de sêmen foi realizada e nenhum espermatozóide foi observado, além disso, neste período, foi notada maior agressividade entre alguns cães e maior libido após o procedimento cirúrgico.

Tabela 3: Médias dos parâmetros seminais, volume (VOL), motilidade espermática (MOT), vigor (VIG), concentração espermática total do ejaculado (CONC T), porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais (N), resultados do teste hiposmótico (HIPO) e porcentagem de células íntegras observadas na coloração com sonda fluorescente (FLUOR) no ejaculado de 20 cães adultos.

Cão	VOL (mL)	MOT (%)	VIG (%)	CONC T (x 10 ⁶)	N (%)	HIPO (%)	FLUOR (%)
1	5,57	93,33	4,67	292,28	82,77	75,67	96,33
2	3,50	70,00	4,00	345,67	82,33	68,33	87,67
3	5,33	0,00*	0,00*	36,71	4,00*	0,00*	0,00*
4	3,50	88,33	3,67	314,92	89,00	84,33	78,33
5	2,17	83,33	3,67	480,33	87,33	83,00	83,00
6	1,67	60,00*	2,67*	231,08	72,67	76,67	83,33
7	2,00	73,33	3,33	20,17	76,00	72,33	73,33
8	4,50	86,67	4,33	251,25	80,83	89,67	82,00
9	2,50	88,33	3,67	276,33	42,50*	86,33	89,67
10	2,67	90,00	3,33	129,50	85,67	90,67	94,00
11	2,83	91,67	4,00	134,17	83,50	90,00	92,00
12	3,50	16,67*	2,33*	14,17*	29,17*	31,67*	15,33*
13	2,83	91,67	4,33	271,33	89,83	89,00	90,00
14	2,83	91,67	4,00	273,42	81,33	87,00	74,33
15	3,50	91,67	4,00	343,67	83,50	85,33	72,00
16	2,50	93,33	4,33	269,96	88,17	92,33	86,67
17	5,00	88,33	4,00	176,98	87,33	90,00	75,00
18	1,50	83,33	3,67	980,63	90,50	84,67	78,00
19	3,23	88,33	4,67	520,58	91,00	90,67	91,67
20	3,17	85,00	4,00	499,17	88,17	88,00	86,33

* Parâmetros considerados abaixo do normal para a espécie (SEAGER & PLATZ, 1977).

Tabela 4: Médias das alterações morfológicas dos espermatozóides de ejaculados de 20 cães adultos. Defeitos maiores, defeitos menores, defeitos de cabeça, defeitos de cauda e defeitos de acrossomo.

Ordem	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos de Cabeça (%)	Defeitos de Cauda (%)	Defeitos de Acrossomo (%)
1	4,87	12,37	0,8	8,3	1,0
2	3,83	13,83	1,3	6,2	1,2
3	55,50	5,83	0,7	27,7	0
4	7,33	3,67	1,5	5,2	0,8
5	7,50	5,17	0,3	8,9	1,2
6	21,17	6,17	3,0	6,0	1,0
7	13,83	10,17	1,3	4,3	2,0
8	12,17	7,00	1,3	3,2	3,5
9	53,33	5,17	0,2	5,3	1,3
10	11,00	3,33	0,2	3,8	2,8
11	11,67	4,83	2,7	8,5	3,3
12	30,17	7,33	7,0	42	2,5
13	6,00	4,17	1,3	2,8	0,5
14	12,67	6,00	1,7	6,8	2,7
15	12,83	3,67	1,8	5,3	1,7
16	8,67	3,17	1,0	5,3	0,8
17	8,67	4,00	1,7	3,2	2,3
18	6,50	3,00	1,5	3,0	1,8
19	5,67	3,33	1,8	2,7	0,7
20	7,67	4,17	1,5	7,0	1,7

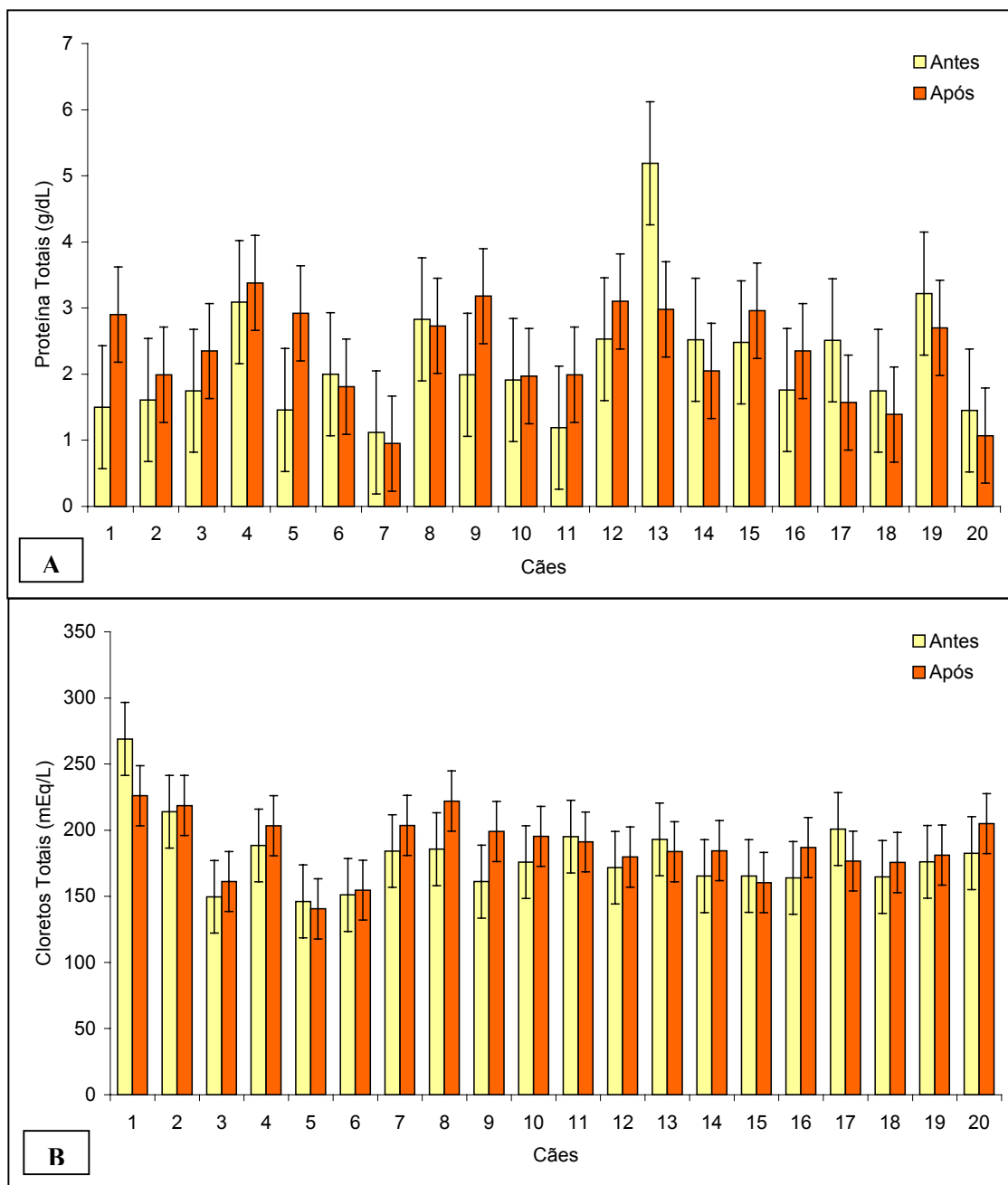


Figura 1: Médias e desvios padrão das concentrações de proteínas totais (A) e de cloretos totais (B) de amostras do plasma seminal de 20 cães adultos.

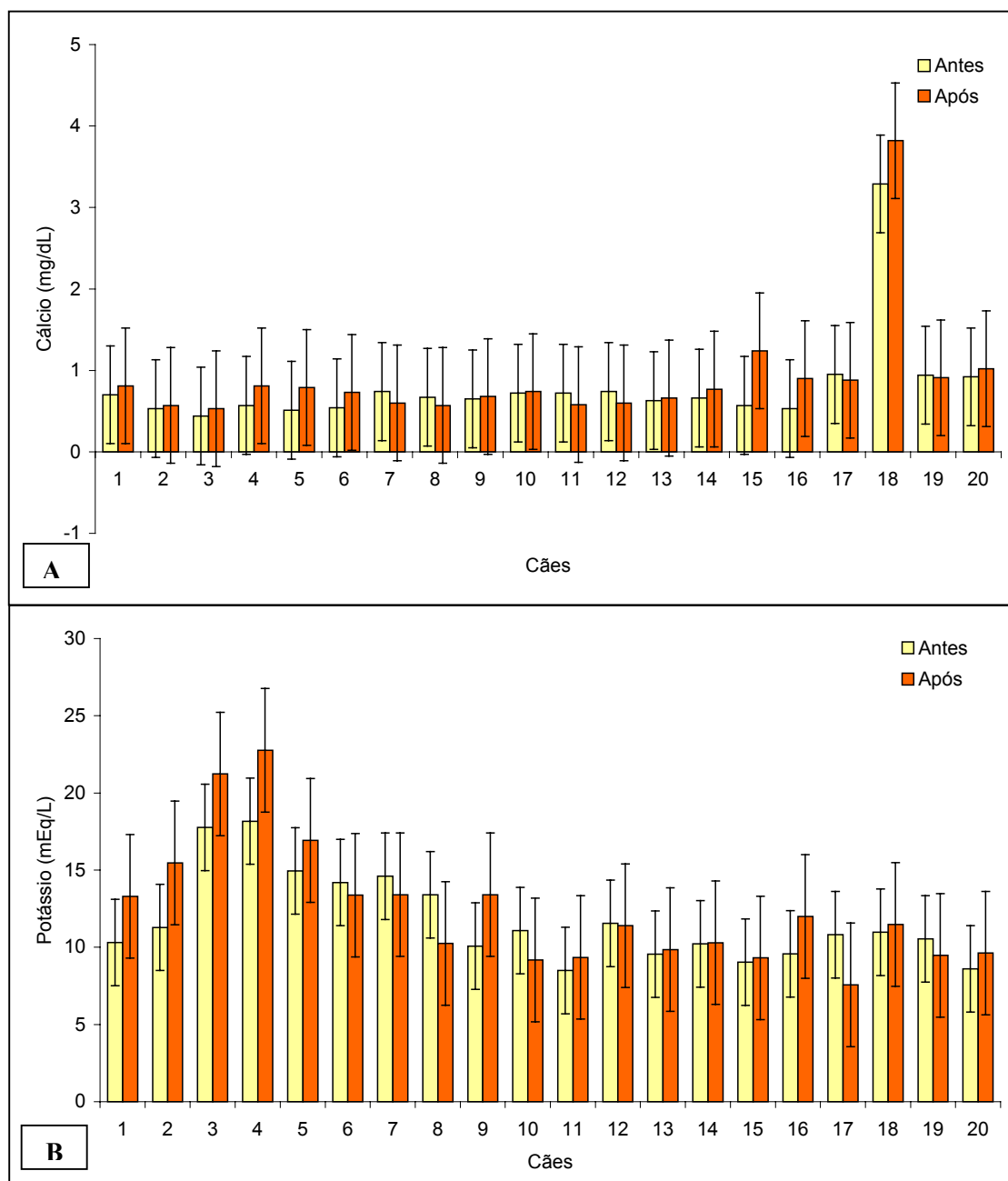


Figura 2: Médias e desvios padrão das concentrações de cálcio (A) e de potássio (B) de amostras do plasma seminal de 20 cães adultos.

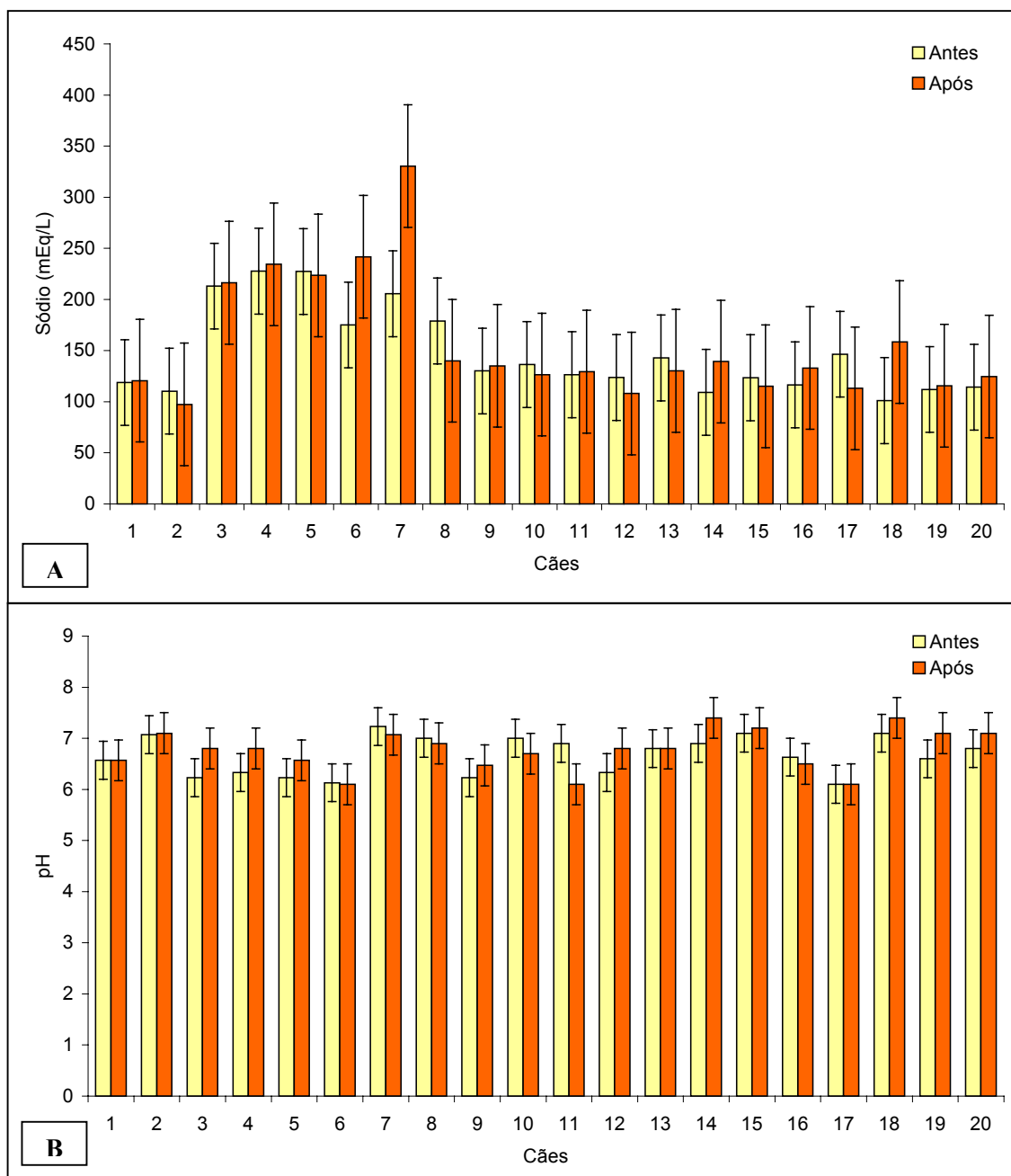


Figura 3: Médias e desvios padrão das concentrações de sódio (A) e pH (B) de amostras do plasma seminal de 20 cães adultos.

Tabela 5: Densidade óptica integrada (IOD) das bandas protéicas (B) e seus pesos moleculares (PM) de amostras do plasma seminal de 20 cães adultos, antes da deferentectomia, encontradas no gel de separação à 13% (SDS-PAGE).

PM	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19
(kDa)	100,6	75,8	73,5	67,0	58,6	52,3	49,7	44,4	42,6	34,4	33,2	29,7	29,2	26,4	23,6	22,0	20,9	19,5	17,1
1	32,1	-	34,7	11,2	68,3	-	60,3	-	29,9	-	0,6	-	-	27,7	25,9	29,5	38,4	12,7	13,1
2	31,3	42,5	23,1	39,3	51,3	14,2	29,1	-	20,9	-	23,6	25,8	45,7	105,3	55,6	-	139,7	44,2	84,4
3	-	35,0	54,2	-	-	-	58,6	-	41,8	-	45,0	60,3	-	73,4	-	-	-	133,4	95,6
4	-	97,8	121,8	82,1	74,3	-	122,2	-	-	69,1	84,4	86,0	76,4	146,2	104,9	-	193,6	236,7	118,3
5	30,7	34,2	107,5	50,6	63,1	-	70,2	-	-	-	11,1	-	-	169,3	14,9	21,6	-	38,4	13,6
6	-	12,1	93,3	67,1	34,0	-	56,7	-	-	0,5	4,9	18,4	-	29,4	75,0	59,9	-	29,9	20,9
7	-	-	55,8	53,2	17,2	-	34,2	-	-	-	0,3	-	-	16,2	-	-	-	52,4	50,3
8	73,0	-	79,9	153,1	71,3	-	102,8	-	-	-	109,2	85,6	79,8	188,1	63,2	60,5	74,7	258,4	140,0
9	41,8	-	73,1	79,3	62,8	-	81,5	-	79,1	-	59,5	45,7	52,0	163,6	-	83,1	110,4	122,9	136,6
10	73,5	-	-	73,9	69,2	24,4	81,6	51,6	60,0	61,5	76,8	66,5	-	164,0	72,4	91,1	-	160,2	121,8
11	-	63,6	-	62,7	61,4	-	72,6	52,5	59,7	-	62,2	69,1	-	100,1	140,7	81,9	-	167,9	97,7
12	-	-	58,7	37,8	35,0	-	48,3	45,0	-	-	58,1	73,6	-	94,5	81,6	65,1	-	139,4	107,5
13	-	-	49,8	46,1	41,0	-	39,9	-	58,0	-	68,0	82,4	62,3	107,6	-	-	-	207,4	138,0
14	-	-	89,7	55,7	-	-	55,7	-	74,4	49,6	63,7	-	-	141,0	-	-	85,3	106,7	128,3
15	-	-	86,8	70,1	41,7	-	59,5	-	68,0	-	61,7	52,7	67,2	68,5	82,8	81,2	55,9	59,4	122,3
16	-	-	85,0	68,0	50,5	-	64,7	83,0	-	-	76,3	-	51,0	135,3	-	-	-	283,0	91,0
17	-	64,3	-	47,0	-	-	60,1	-	58,9	-	52,4	-	66,4	133,2	-	60,9	57,0	123,1	93,9
18	-	-	167,4	75,2	59,1	34,7	73,3	71,3	48,4	-	82,5	-	-	189,3	112,4	85,8	107,1	120,4	115,1
19	-	100,3	-	58,0	66,7	-	57,1	62,2	50,1	-	66,7	-	74,4	204,7	125,1	-	-	212,0	153,9
20	-	-	98,1	77,6	97,2	-	83,7	77,9	59,7	-	80,7	-	-	268,7	78,3	80,4	-	125,5	-

PM em kDa

Tabela 6: Densidade óptica integrada (IOD) das bandas protéicas (B) e seus pesos moleculares (PM) de amostras do plasma seminal de 20 cães adultos, antes da deferentectomia, encontradas no gel de separação à 22% (SDS-PAGE).

	B20	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29	B30	B31	B32	B33	B34	B35	B36	B37
PM	15,6	14,3	13,5	12,7	11,7	10,5	9,8	9,4	8,7	7,8	7,1	6,3	5,9	5,6	4,9	4,5	4,0	3,6
1	447,4	43,9	51,9	55,1	93,1	146,3	-	-	64,0	20,4	53,8	-	-	31,8	57,1	-	-	44,4
2	381,3	-	103,8	56,8	62,9	131,3	55,1	25,4	50,2	65,8	-	-	-	38,4	45,4	-	74,8	-
3	500,1	-	59,2	109,2	78,6	174,1	-	65,9	67,5	43,9	-	-	-	48,6	34,1	-	-	44,5
4	448,2	-	104,2	71,7	72,9	168,8	-	54,8	54,9	47,0	-	-	31,1	44,5	48,2	-	-	68,9
5	345,9	44,2	92,5	62,4	64,2	109,8	33,1	43,0	56,6	34,6	25,1	20,1	16,1	52,9	37,9	20,6	-	40,3
6	326,8	-	97,6	40,5	57,0	122,9	21,5	55,4	44,5	22,2	37,5	-	-	27,2	31,1	28,7	-	-
7	386,9	-	114,9	73,3	59,8	125,2	-	99,6	66,6	30,2	39,1	22,0	-	37,1	38,9	27,9	34,4	36,9
8	394,4	-	116,8	82,4	67,4	135,3	48,4	-	71,3	64,5	69,9	-	42,8	56,2	38,3	-	-	73,2
9	600,6	-	195,8	128,5	81,6	229,8	105,4	-	91,6	61,6	-	41,6	49,4	49,7	79,3	38,4	-	73,1
10	572,0	-	145,7	99,1	93,2	227,7	-	78,0	69,8	48,5	63,2	23,8	43,3	68,1	34,6	-	-	32,9
11	549,0	-	128,1	83,2	75,6	190,2	86,2	52,1	50,8	42,2	-	56,1	-	60,3	37,9	-	-	59,8
12	441,9	51,1	75,0	96,3	75,0	142,0	42,3	-	52,2	29,5	70,1	-	-	43,6	56,8	32,2	-	58,3
13	457,6	46,0	98,2	59,2	81,5	124,7	-	59,7	42,5	33,3	-	-	-	30,7	40,2	-	-	52,1
14	469,7	42,8	94,4	63,1	91,9	151,1	-	49,3	31,2	34,5	-	-	55,1	35,7	67,3	39,9	-	-
15	808,6	-	193,0	198,3	161,6	250,8	-	78,6	107,5	94,2	89,4	68,6	76,7	93,4	92,2	71,1	-	62,3
16	619,9	100,1	104,5	89,3	125,7	182,4	-	83,5	42,6	70,0	70,9	33,7	37,9	60,5	64,4	-	-	-
17	516,9	59,1	116,5	68,8	106,5	136,1	-	61,5	34,3	53,2	40,2	38,4	43,9	32,7	36,6	22,5	38,0	24,8
18	425,1	-	93,6	58,4	80,0	135,8	-	87,0	50,2	70,4	39,9	-	-	52,4	46,3	-	-	-
19	407,7	-	109,2	77,7	106,3	101,2	51,4	-	56,0	46,3	27,5	17,6	-	31,2	28,2	-	-	30,5
20	350,6	43,0	35,8	34,2	35,5	52,0	76,6	32,5	19,5	34,6	-	-	25,4	30,7	37,6	-	-	11,7

PM em kDa

Tabela 7: Densidade óptica integrada (IOD) das bandas protéicas (B) e seus pesos moleculares (PM) de amostras do plasma seminal de 20 cães adultos, após a deferentectomia, encontradas no gel de separação à 13% (SDS-PAGE).

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19
PM	100,6	75,8	73,5	67,0	58,6	52,3	49,7	44,4	42,6	34,4	33,2	29,7	29,2	26,4	23,6	22,0	20,9	19,5	17,1
1	24,1	-	37,6	26,1	-	-	71,9	-	-	-	0,8	-	-	23,8	-	14,5	-	11,4	13,8
2	47,9	43,1	-	58,1	-	28,8	17,8	53,9	-	-	25,3	27,1	-	256,4	63,2	62,4	-	102,4	89,4
3	-	42,3	55,1	-	27,0	78,2	69,1	-	-	-	58,9	56,7	-	110,0	-	-	-	155,0	140,6
4	-	96,7	-	68,4	136,9	-	111,3	-	-	-	76,9	100,7	-	118,1	-	55,7	-	71,4	290,9
5	-	63,4	-	48,1	24,2	-	14,8	-	-	-	13,5	-	-	38,1	-	-	-	53,2	11,5
6	-	-	65,9	11,8	36,2	-	14,6	-	-	5,2	0,8	34,0	-	26,1	55,9	-	-	80,0	56,3
7	-	-	64,3	102,8	83,6	-	71,9	-	-	-	69,9	58,7	-	167,6	-	-	-	248,5	105,4
8	-	-	25,4	33,3	-	-	44,1	-	-	-	36,4	43,7	-	85,9	-	-	-	156,7	66,5
9	-	-	-	66,8	114,3	-	90,8	-	-	-	92,4	73,1	-	178,0	-	-	108,5	108,5	130,6
10	75,5	-	-	80,2	64,7	97,5	65,0	47,3	-	43,0	57,4	70,8	-	168,0	-	-	-	237,5	127,7
11	-	68,1	-	66,5	63,3	-	85,1	98,9	-	52,6	73,7	89,9	-	128,1	-	-	81,7	223,9	114,1
12	-	-	31,4	39,2	35,4	-	57,4	-	-	-	56,6	83,9	-	121,6	-	-	-	207,4	135,6
13	-	-	60,0	81,9	-	-	114,5	-	-	58,8	82,2	264,3	-	157,1	-	-	233,2	147,1	125,4
14	-	-	55,9	101,6	71,0	-	57,1	-	-	60,3	60,8	47,6	-	134,2	48,6	64,3	59,6	120,8	115,3
15	-	-	69,0	68,6	82,0	-	78,3	77,6	-	65,6	52,8	49,0	-	90,8	88,5	84,2	85,0	-	114,7
16	-	26,2	66,0	81,7	32,3	-	111,9	-	-	-	63,7	57,8	-	182,0	54,0	-	-	203,5	112,5
17	41,9	33,4	64,0	67,4	46,2	-	72,2	74,2	-	-	63,3	80,8	-	193,6	-	-	-	147,4	102,7
18	-	55,4	54,9	52,7	60,4	-	118,0	36,6	-	61,6	76,3	-	-	278,1	52,7	-	-	220,8	144,1
19	-	60,3	-	52,8	40,2	-	62,8	-	-	-	80,8	89,2	-	195,2	-	-	-	199,9	118,6
20	-	-	76,5	79,7	80,1	-	119,7	-	-	-	118,0	-	-	334,3	92,6	-	-	-	-

PM em kDa

Tabela 8: Densidade óptica integrada (IOD) das bandas protéicas (B) e seus pesos moleculares (PM) de amostras do plasma seminal de 20 cães adultos, após a deferentectomia, encontradas no gel de separação à 22% (SDS-PAGE).

	B20	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29	B30	B31	B32	B33	B34	B35	B36	B37
PM	15,6	14,3	13,5	12,7	11,7	10,5	9,8	9,4	8,7	7,8	7,1	6,3	5,9	5,6	4,9	4,5	4,0	3,6
1	362,2	39,4	40,6	44,5	77,0	126,6	--	--	47,9	20,5	48,2	--	--	34,0	57,8	--	--	46,6
2	465,0	79,9	89,6	57,0	51,4	172,7	85,2	47,7	62,9	60,4	44,6	--	--	47,0	51,2	--	70,3	62,9
3	478,7	--	67,0	79,5	95,4	161,4	--	81,6	59,8	48,7	--	--	23,7	44,1	53,2	--	--	65,4
4	446,7	--	90,4	75,0	72,3	149,5	--	67,6	56,0	42,1	16,5	37,2	30,7	37,3	47,0	--	--	74,4
5	330,5	--	135,5	50,6	36,4	123,9	55,4	57,6	31,4	26,7	37,2	--	--	27,6	24,7	14,0	18,4	99,2
6	273,5	--	78,7	45,8	52,4	101,1	38,2	21,8	32,3	31,4	--	--	--	20,5	22,8	--	22,5	--
7	454,2	--	126,5	59,5	120,5	209,1	82,1	--	46,7	52,9	60,3	--	37,0	49,3	46,4	31,5	--	66,1
8	581,7	--	160,5	108,2	124,7	180,8	107,7	--	73,6	74,4	--	--	--	63,4	50,1	43,0	--	69,5
9	584,0	--	194,3	10,6	96,0	206,7	59,0	67,9	63,7	76,4	57,0	60,4	58,3	40,5	54,4	--	--	116,0
10	561,5	--	118,4	104,8	108,5	178,8	50,5	65,5	61,5	55,4	71,7	--	55,6	58,6	45,9	--	--	74,0
11	612,5	--	170,4	101,7	102,3	220,3	--	63,4	77,7	56,3	--	39,7	41,7	52,5	59,7	--	--	67,9
12	541,9	42,7	67,8	92,0	97,9	152,5	--	--	80,6	41,1	37,1	--	--	37,3	60,9	--	--	24,8
13	449,9	65,9	68,0	75,5	104,0	112,1	--	43,2	60,0	25,3	27,8	--	--	38,7	27,0	37,4	--	--
14	497,2	36,5	117,7	76,2	94,0	113,4	54,2	36,9	41,8	77,6	46,2	--	--	47,9	57,7	--	--	19,9
15	689,0	--	152,3	175,9	124,8	267,9	--	92,2	68,1	93,1	81,4	43,2	71,4	83,8	78,4	62,7	--	--
16	596,1	85,7	128,2	97,9	101,4	175,2	--	74,2	42,7	73,2	81,6	39,9	--	64,8	49,6	--	--	23,7
17	443,4	50,5	87,0	74,1	87,7	158,3	--	47,6	39,5	55,4	28,2	39,7	--	52,6	29,8	--	--	33,2
18	491,4	58,6	114,9	77,9	88,9	134,1	--	60,7	102,5	68,5	45,6	40,4	--	53,0	50,1	--	--	--
19	448,8	46,5	91,7	66,9	80,4	149,7	--	63,4	76,6	45,6	36,4	--	29,4	28,0	31,3	48,4	--	41,9
20	537,9	83,1	67,3	92,8	86,1	220,4	--	--	71,5	72,9	60,9	--	76,9	71,0	110,0	--	--	--

PM em kDa

Tabela 9: Valores do coeficiente de correlação (r) e de p entre as bandas B4 (67 kDa) e B5 (58,6 kDa), considerando as variáveis motilidade espermática, vigor, porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais, resultados do teste hiposmótico e porcentagem de integridade de membrana observada na coloração com sonda fluorescente, de 20 cães adultos.

Parâmetros	B4 (67 kDa)		B5 (58,6 kDa)	
	r	p	r	p
Motilidade	0,66	0,002	0,68	0,001
Vigor	0,56	0,01	0,66	0,002
Normais	0,55	0,01	0,58	0,007
Hiposmótico	0,77	0,00009	0,68	0,001
Fluorescência	0,57	0,009	0,59	0,006

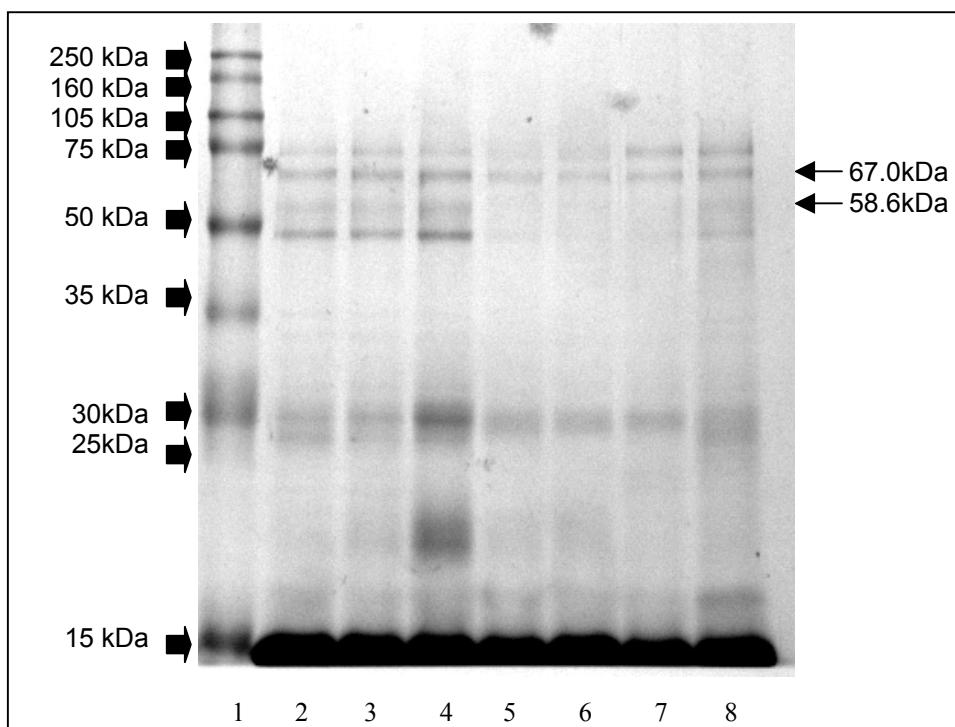


Figura 4: Eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE) à 13% de concentração no gel separador, em sistema descontínuo alcalino de proteínas do plasma seminal canino. Canaleta 1, Marcador de Peso Molecular (Full molecular weight range, 10 a 250 kDa, Amersham Biosciences); setas largas indicam as bandas formadas pelo marcador de peso molecular. Canaletas de 2 a 8 são amostras de plasma seminal canino; setas finas indicam as bandas proteicas B4, de 67 kDa e B5, de 58,6 kDa.

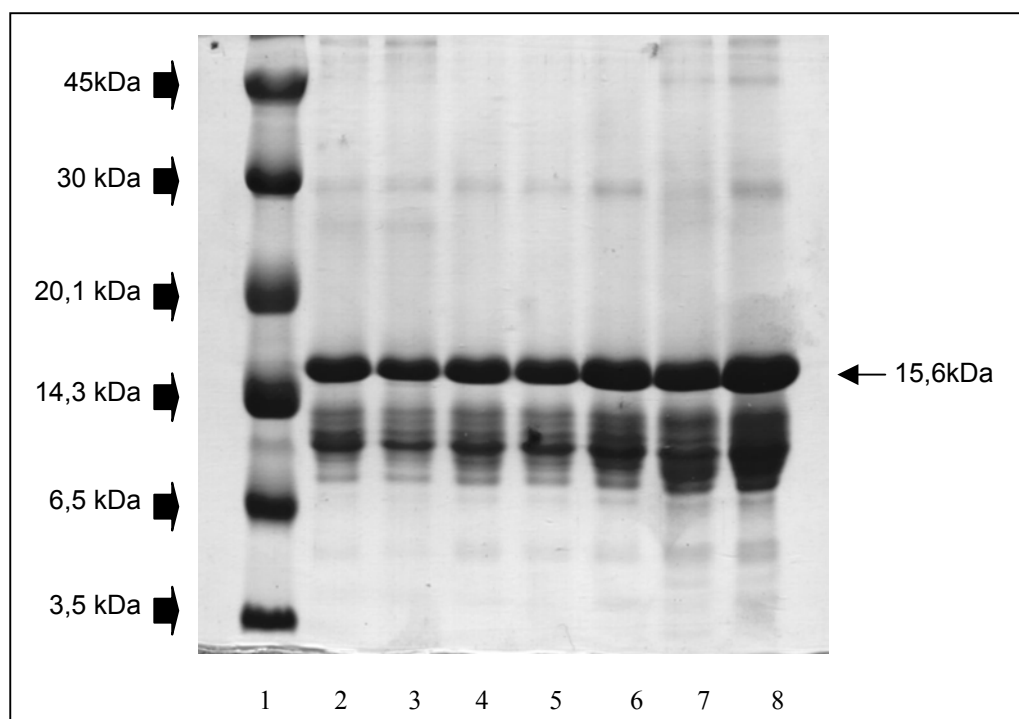


Figura 5: Eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE) à 22% de concentração no gel separador, em sistema descontínuo alcalino de proteínas do plasma seminal canino. Canaleta 1, Marcador de Peso Molecular (Low molecular weight range, 2,5 a 45 kDa, Amersham Biosciences); setas largas indicam as bandas formadas pelo marcador de peso molecular. Canaletas de 2 a 8 são amostras de plasma seminal canino; seta fina indica a banda proteíca B20, de 15,6kDa.

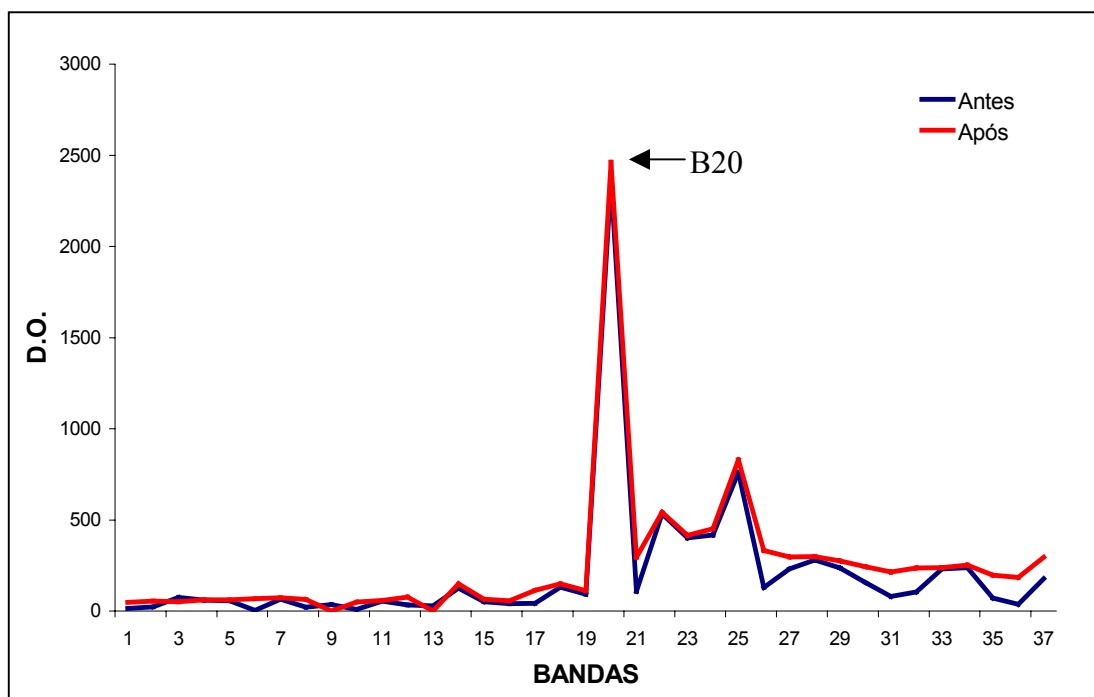


Figura 6: Perfil gráfico da densidade óptica (D.O.) das proteínas do plasma seminal antes e após a deferentectomia. Cada pico representa a quantidade de proteína em cada banda, medida pela densidade óptica. A seta indica a banda (B20 de 15,6 kDa) encontrada em maior concentração.

6. DISCUSSÃO

O armazenamento de germoplasma abre fronteiras para o estudo da preservação de espécies de canídeos silvestres, sendo uma das principais formas de aumentar a variabilidade genética (JOHNSTON & LACY, 1995). Neste contexto, novos métodos têm sido desenvolvidos no intuito de viabilizar a criopreservação e técnicas de avaliação da função espermática no cão.

Em vista da dificuldade de se realizar testes *in vivo* para avaliação da fertilidade no cão e sabendo que os ensaios *in vitro* são capazes de mostrar quais os aspectos da função espermática estão alterados (AMANN, 1989, ZHANG et al., 1999) optou-se, nesse estudo, avaliar a fertilidade *in vitro*, utilizando-se de técnicas convencionais e complementares. Como técnicas convencionais usou-se a verificação da motilidade espermática, vigor, concentração espermática por ejaculado e porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais. Como técnicas complementares usou-se o teste hiposmótico e a coloração com sondas fluorescentes. Assim, acreditou-se que a união desses testes seria capaz de prever a fertilidade *in vivo*.

Os animais foram escolhidos aleatoriamente, apenas respeitando o peso corporal entre 15 e 20 Kg, pela facilidade de manejo e custos com alimentação. Porém, animais que inviabilizaram o experimento foram descartados. Entre eles, estavam os que

apresentaram sorologia positiva para brucelose e/ou leptospirose, aqueles animais agressivos ou que não se condicionaram à colheita. O período de condicionamento variou entre os cães e em alguns casos excederam as três semanas. Animais com qualidade de sêmen inferior àsquelas recomendadas para a espécie foram incluídos no estudo, visando analisar as diferenças entre os componentes bioquímicos do ejaculado desses cães e o de cães com qualidade de sêmen superior.

Nesse estudo, a alta correlação entre os resultados do teste hiposmótico e a motilidade espermática e o vigor são semelhantes àquela observada no cão para o sêmen fresco (KUMI-DIAKA & BADTRAM, 1994, RODRIGUEZ-GIL et al., 1994), resfriado (KUMI-DIAKA & BADTRAM, 1994) e congelado (MOHANACHANDRAN NAIR et al., 1998), e diferente daqueles obtidos por INAMASSU et al. (1999), que não encontraram correlação significativa entre as variáveis, nesta mesma espécie.

A sensibilidade desse teste tem gerado grande discussão em virtude da sua correlação ou não com a motilidade espermática; isto porque a motilidade dos espermatozóides não é dependente somente do transporte de elementos pela membrana, mas de inúmeros fatores bioquímicos (MOHANACHANDRAN NAIR et al., 1998). Contudo, estudos têm demonstrado a correlação do teste hiposmótico com a reação do acrossomo (JEYENDRAN et al., 1984), fertilidade *in vitro* (JEYENDRAN et al., 1984) e *in vivo* (REVELL & MRODE, 1994), podendo aumentar, de

forma significativa, a previsão da capacidade de fertilização do sêmen (FRASER, 1984).

Os resultados do teste hiposmótico correlacionaram-se positivamente com a porcentagem de espermatozóides normais, igualmente determinada por JEYENDRAN et al. (1984). Como nos estudos de KUMI-DIAKA & BADTRAM (1994) nenhuma correlação foi encontrada entre o teste hiposmótico e os defeitos do acrossomo.

Embora, uma correlação negativa tenha sido observada entre os resultados do teste hiposmótico e apenas a porcentagem de defeitos de cauda espermática, esses achados não invalidam a utilização do teste hiposmótico para a verificação da integridade da cabeça, pois esse teste avalia a atividade funcional da membrana como um todo. Porém, as alterações, provocadas pela solução hiposmótica sobre a membrana da cabeça espermática, não podem ser evidenciadas em microscópio de contraste de fase (JEYENDRAN et al., 1984).

Como no presente estudo, a porcentagem de espermatozóides com a membrana íntegra observada na coloração com sondas fluorescentes, também tem sido correlacionada a motilidade espermática (ALTHOUSE & HOPKINS, 1995). A correlação negativa com os defeitos de cabeça e cauda espermática eram esperadas, desde que as sondas fluorescentes marcam células com defeitos estruturais de membrana. Portanto, espermatozóides corados com o Karras e vistos serem portadores de defeitos de cabeça e cauda são células com

chances possíveis de apresentarem membranas lesadas.

Assim como no estudo de NEILD et al. (1999) em eqüinos, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os resultados do teste hiposmótico e a porcentagem de espermatozóides com a membrana íntegra na coloração fluorescente. Resultados opostos foram verificados por VASQUEZ et al. (1997) no sêmen de suínos.

O teste hiposmótico e a coloração fluorescente são formas diferentes de se avaliar a membrana. O teste hiposmótico avalia a integridade funcional da membrana baseado nas suas propriedades osmóticas, enquanto a fluorescência avalia a integridade estrutural baseada na impermeabilidade a grandes moléculas. Um espermatozóide vivo pode ter uma membrana não funcional, mas ainda estruturalmente intacta. Nesse sentido, o teste hiposmótico poderia ser mais sensível (VASQUEZ et al., 1997).

A despeito da validade dos testes para avaliação da integridade, tanto funcional, como estrutural, eles devem ser vistos de forma conjunta como análises complementares aos parâmetros seminais comumente observados, desde que isso aumentaria a possibilidade de previsão da fertilidade *in vivo* de um determinado animal.

Nos 20 cães estudados, encontrou-se uma grande variação nas concentrações de proteína total, assim como relatado por WALES & WHITE (1965). Porém, os valores médios obtidos estão de acordo com os encontrados por vários autores (BARTLETT, 1958, 1962,

WALES & WHITE, 1965, DUBIEL, 1974, BRUSCHI et al., 1979). Nenhuma correlação foi encontrada entre a concentração de proteínas totais e os parâmetros seminais, apesar de já ter sido relatada em outras espécies (MOORE & HIBBIT, 1976, DOTT et al., 1979, BAAS et al., 1983, SOUZA et al., 2001).

Embora, a segunda fração do ejaculado canino apresente maior concentração de proteína total (ENGLAND et al., 1990), quando comparada a primeira e terceira frações, a deferentectomia não foi capaz de alterar suas concentrações no plasma seminal, visto que animais deferentectomizados não ejaculam a segunda fração. O mesmo achado foi descrito no homem por VERDEJO et al. (1998).

Os níveis médios de cloretos totais (180 mEq/L), determinados nesse estudo, antes da deferentectomia, são pouco mais elevados do que aqueles encontrados por BARTLETT (1962) que relata uma concentração média de 152 mEq/L e menos elevados do que 450 a 580 mEq/L verificados em outro estudo (QUINN et al., 1965). Os cloretos totais, apesar de serem os íons encontrados em maior concentração no plasma seminal canino (MANN, 1964 apud MANN & MANN, 1981), pouco se sabe a seu respeito. Não foi encontrada nenhuma referência sobre os níveis de cloretos após a deferentectomia, e sua relação com a fertilidade.

Os níveis médios de cálcio encontrados, nos 20 cães estudados, antes da deferentectomia, foram mais elevados do que aqueles encontrados por QUINN et al. (1965) e ENGLAND et al. (1990).

O cálcio é um importante regulador da fisiologia espermática. Sua concentração é muito maior no plasma seminal quando comparada ao sangue. Nos mamíferos em geral, é secretado principalmente pela próstata, mas uma pequena parte tem origem na vesícula seminal. Está envolvido em várias etapas da maturação dos espermatozóides, na capacitação e reação do acrossomo (KILIÇ et al., 1996). Níveis anormais de cálcio têm sido verificados em homens inférteis (PANDY et al., 1983). No eqüino nenhuma correlação entre este íon e a congelabilidade foi determinada (BARRIER-BATTUT et al., 2002). No presente estudo, nenhuma correlação foi verificada entre os níveis de cálcio e os parâmetros seminais analisados. Porém, uma maior concentração de cálcio foi verificada após a deferentectomia, provavelmente em virtude da ligação do cálcio às proteínas presentes no plasma seminal e na membrana espermática (KARAGIANNIDIS, 1976). A ausência de espermatozóides pode ser a explicação de concentrações mais elevadas de cálcio, no plasma seminal, após a deferentectomia.

Os níveis médios de potássio, encontrados no presente estudo, estão de acordo com aqueles relatados por outros autores no cão (JAMES et al., 1979, ENGLAND et al., 1990, SOUZA et al., 1995).

No homem, a alta concentração de potássio no trato reprodutor masculino foi correlacionada a falta de motilidade de espermatozóides obtidos do epidídimo (SHET & RAO, 1962 apud BATTERSBY & CHANDLER, 1977). Porém, a correlação negativa entre o

potássio e a motilidade espermática encontrada nesse estudo, não foi determinada por outros autores no cão (JAMES et al., 1979, GIRGIS et al., 1980, ROBLERO et al., 1988).

O potássio é captado pelo espermatozóide e utilizado em diversas reações metabólicas (CRABO et al., 1976). Altas concentrações desse íon têm sido implicadas no aumento da taxa de reação do acrossomo do espermatozóide humano *in vitro*, devido à estimulação do influxo de cálcio (ROBLERO et al., 1988, KUMAR et al., 2000). Além disso, meios diluentes contendo maiores concentrações de cátions, entre eles o potássio, elevam o pH intracelular espermático proporcionando um aumento da motilidade progressiva. Contrariamente, quando o pH intracelular é baixo, a motilidade espermática se mantém por um tempo mais prolongado (JONES & BAVISTER, 2000). Os achados do presente estudo confirmam a importância do equilíbrio eletrolítico no meio onde estão contidos os espermatozóides, porém outros estudos devem ser direcionados na tentativa de solucionar esta questão no cão.

O sódio forma cristais com os cloretos e é um importante íon na manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico celular (KIHLESTRÖM, 1972). Embora, não se tenha encontrado nenhuma correlação entre a motilidade espermática e o sódio, da mesma forma que o potássio, este cátion está envolvido na manutenção da motilidade espermática (JONES & BAVISTER, 2000). Os níveis médios de sódio obtidos no presente estudo foram próximos aos já relatados para espécie, anteriormente

(BARTLETT, 1962, JAMES et al., 1979, ENGLAND et al., 1990, SOUZA et al., 1995).

O pH do plasma seminal, dos cães estudados, variou entre 6,10 a 7,23, sendo mais elevado que os valores descritos por JOHNSTON (1991), que encontrou uma variação de 6,3 a 6,7. Provavelmente, os valores diferentes são atribuídos a variação na quantidade de líquido prostático colhido e a diferentes métodos de determinação.

O espermatozóide é uma célula altamente especializada que perde a capacidade de síntese protéica (MYLES et al., 1990). Algumas proteínas necessárias para o processo de fertilização são adquiridas do plasma seminal, as quais se ligam a membrana espermática (MOREAU e MANJUNATH, 1999). Recentemente, alguns estudos têm demonstrado a correlação entre a presença, ausência ou a quantidade dessas proteínas e a fertilidade. Assim, a proposta de se utilizar o perfil protéico do plasma seminal é interessante tanto como marcador de fertilidade, bem como um aditivo seminal ou contraceptivo (KILLIAN et al., 1993). Além disso, o estudo destas proteínas é uma importante parte da fisiologia do trato reprodutivo do macho canino e pode auxiliar na formulação de extensores seminais nessa espécie.

A correlação encontrada nesse estudo entre a densitometria de duas bandas e a motilidade, vigor, porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais, resultados do teste

hiposmótico e a porcentagem de células íntegras observadas na coloração com sondas fluorescentes revelam a importância dessas proteínas na fertilidade do cão, visto que alguns desses parâmetros já foram correlacionados a fertilidade *in vitro* e *in vivo* (JEYENDRAN et al., 1984, REVELL & MRODE, 1994).

Em eqüinos, AMANN et al. (1987), encontrou uma correlação linear baixa, mas significativa entre a porcentagem de motilidade espermática progressiva do sêmen fresco e congelado e a concentração relativa de duas bandas protéicas (19,6 kDa e 15,3 kDa) determinadas pela eletroforese.

Estudos utilizando a eletroforese têm identificado proteínas do plasma seminal marcadoras de fertilidade em bovinos (KILLIAN et al., 1993, CANCEL et al., 1997, GERENA et al., 1998), congelabilidade do sêmen de touros (RONCOLETTA, 1999) e em eqüinos (BRANDON et al., 1999).

Um dos primeiros estudos das proteínas do plasma seminal canino foi realizado por DUBIEL (1974), que encontrou três frações protéicas na eletroforese nativa, presentes em cães férteis ou com distúrbios de fertilidade, porém apenas uma fração foi relatada em cães idosos com azoospermia. Posteriormente, BRUSCHI et al. (1979) relataram as três frações protéicas encontradas por DUBIEL (1974), porém não correlacionaram os achados à fertilidade e nem a análise seminal. Nas condições do presente estudo, os resultados obtidos na

análise eletroforética das proteínas do plasma seminal, usando SDS-PAGE, são originais, tratando-se do primeiro trabalho nesta espécie, onde a densitometria das bandas encontradas foi correlacionada a fertilidade *in vitro*.

Um perfil eletroforético para a espécie canina foi determinado, sendo semelhante entre os cães estudados, e diferente do perfil de outras espécies (LARSON & SALISBURY, 1954, BERTOK & PASZTOR, 1957, KILLIAN et al., 1993, FRAZER & BUCCI, 1996). Esse perfil foi semelhante ao encontrado por MARTINS et al. (2002), no fluído proveniente do epidídimo de cães e àqueles encontrados na secreção prostática estudada por STUBBS & RESNICK (1978) e ISAACS & SHAPER (1985).

Considerando as diferenças anatômicas das glândulas sexuais acessórias entre o cão e outros mamíferos, determinou-se a necessidade do estudo dessas proteínas na espécie canina, não sendo possível a comparação dos dados com outros animais.

O cão apresenta a próstata como única glândula sexual acessória (DORFMAN e BARSANTI, 1995). Assim, a deferentectomia proporcionou a distinção entre as proteínas provenientes da rede de túbulos de transporte espermático e daquelas de origem prostática. Este estudo mostrou que duas bandas, a B9 (42,6 kDa) e a B13 (29,2 kDa) são provenientes da rede de túbulos, pois encontravam-se ausentes no plasma seminal dos cães após a deferentectomia; ou então, somente uma

pequena concentração é secreta pela próstata o que limitou a visualização das bandas no plasma seminal colhido após o procedimento cirúrgico.

Uma diminuição significativa da concentração da banda B3 (73,5 kDa) foi observada após a deferentectomia. Provavelmente, esta banda é secretada pela rede de tubos e pela próstata; após a deferentectomia, uma oclusão na rede de tubos impediu a passagem da proteína para o plasma seminal o que fez com ocorresse uma diminuição na sua concentração.

Contrariamente, a IOD das bandas B29 (7,8 kDa) e B37 (3,6 kDa) foram significativamente mais elevadas após a deferentectomia, sendo a hipótese para esse achado a intensa ligação dessas proteínas aos espermatozóides, que após a deferentectomia estavam ausentes; ou então, a presença de enzimas degradadoras (QUINLIVAN, 1972) das proteínas em questão, provenientes da rede de túbulos .

Embora, no presente estudo, técnicas diferentes tenham sido usadas, cogita-se a possibilidade de alguma dessas proteínas serem semelhantes àquelas encontradas em outras espécies e correlacionadas a fertilidade. Usando a técnica de “western blotting”, BRANDON et al. (1999) verificaram grande similaridade entre uma proteína de 72 kDa, encontrada no plasma seminal eqüino, com a osteopontina bovina de 55 kDa, proteína identificada no plasma seminal de touros de alta fertilidade (KILLIAN et al., 1993, CANCEL et al., 1997).

FRENETTE et al. (1985) estudaram as proteínas do líquido prostático canino e verificaram uma produção elevada de arginina esterase pela glândula prostática, um possível marcador deste tecido.

No presente estudo, a banda B20, de 15,6 kDa, foi encontrada em concentração superior em relação as outras bandas determinadas. Estes resultados supõem que se trata de uma das subunidades da arginina esterase, que compõe 90% do total de proteínas contidas no fluído prostático canino (ISAACS & SHAPER, 1985). No cão, esta proteína tem sido considerada um marcador imunológico específico da glândula prostática normal ou hiperplásica (McENTEE et al., 1987).

Essa proteína pode ser um elemento importante no processo de fertilização, já que tem grande similaridade com um HBP eqüina (CALVETE et al., 1995), a qual tem sido correlacionada a fertilidade.

Neste experimento, com relação à técnica de eletroforese, a grande dificuldade foi, em um mesmo gel, visualizar proteínas de alto e baixo peso molecular. Isto porque, as proteínas de alto peso moleculares compõem uma pequena fração do total de proteínas contidas no plasma seminal do cão e as de baixo peso molecular apresentam-se em grande concentração. Assim, quando foi aplicada uma alta concentração das proteínas totais no gel, as bandas de alto peso molecular foram evidentes, porém ocorreu um empacotamento das bandas de baixo peso molecular o que não permitia a distinção entre essas bandas. Contrariamente, quando

foi aplicada uma pequena quantidade de proteína total, as bandas de alto peso molecular desapareciam e as de baixo peso molecular tornavam-se evidentes e distintas umas das outras.

Desta forma, optou-se por utilizar duas concentrações de géis de separação, onde no gel de menor concentração foi possível aplicar uma quantidade maior de proteína total e visualizar, com clareza, as bandas de maior peso molecular. E num gel de maior concentração foi aplicada uma concentração de proteína total menor, sendo possível distinguir as bandas de menor peso molecular.

Após a deferentectomia, observou-se que alguns animais apresentavam uma maior libido e maior agressividade aos outros machos dentro do canil. Uma das explicações plausíveis seria a alteração transitória provocada pela deferentectomia sobre o tecido testicular. URRY et al. (1976) verificaram um aumento no número de células de Leydig em cães imaturos após 3 semanas da deferentectomia; porém, nenhum comentário é feito em relação aos efeitos da deferentectomia sobre este tipo celular, em cães adultos. Se este fato também ocorre nos cães adultos, uma produção mais elevada de testosterona poderia acontecer, como já evidenciada em ratos temporariamente (KINSON et al., 1977), o que levaria a uma alteração de comportamento.

Alterações tardias não foram acompanhadas em virtude do final do experimento. Os espermatozóides não estavam presentes 15 dias após o procedimento cirúrgico, assim como já relatado por SILVA et

al. (1993).

Segundo RONCOLETTA, (1999), os aspectos bioquímicos do ejaculado deveriam ser incluídos no conceito de fertilidade, os quais auxiliariam no melhor conhecimento da fisiologia dos eventos envolvidos na fertilização e no desenvolvimento de um diluente ideal para cada espécie.

Os estudos realizados em bovinos têm demonstrado o mérito desta linha de pesquisa e esses resultados promissores têm encorajado novos trabalhos em diferentes espécies, tanto na identificação de animais de alta ou baixa fertilidade, bem como no estudo básico da fisiologia dos eventos envolvidos na fertilização.

Nos cães, pesquisas futuras são necessárias na tentativa de investigar a correlação de uma ou várias proteínas do plasma seminal com a fertilidade *in vivo*. Com esses resultados a mão, sua aplicação prática será inevitável, tanto nos cães domésticos, como nos silvestres, seja para a elaboração de diluentes, contraceptivos, seleção de doadores de sêmen ou no conhecimento da fisiologia da reprodução dessa espécie tão cativante.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo e nas condições do experimento, concluiu-se que:

- 1) O perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal modifica-se após a deferentectomia.
- 2) A composição bioquímica do plasma seminal diferiu após a deferentectomia, apenas em relação às concentrações de cálcio.
- 3) Há uma correlação positiva entre a densitometria de duas bandas protéicas (67 kDa e 58,6 kDa) do plasma seminal e a fertilidade *in vitro*;
- 4) Há uma correlação negativa entre o potássio presente no plasma seminal e a fertilidade *in vitro*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTHOUSE, G.C., HOPKINS, S.M. Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores. **Theriogenology**, v.43, p.595-603, 1995.
- AMANN, R.P., CRISTANELLI, M.J., SQUIRES, E.L. Proteins in stallion seminal plasma. Equine reproduction IV. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.35, p.113-20, 1987.
- AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **J. Androl.**, v.10, p.89-98, 1989.
- AURICH, J.E., KÜHNE, A., HOPPE, H., AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v.46, p.791-7, 1996.
- AYDOS, K., SOYGUR, T., KUPELI, B., UNSAL, A., TOLUNAY, O., ERDEM, E., GUVEN, C. KUPELI, S. Testicular effects of vasectomy in rats: ultrastructural and immunohistochemical study. **Urology**, v.51, p.1051-6, 1998.
- AYYAGARI, R.R., FAZLEABAS, A.T., DAWOOD, M.Y. Seminal plasma proteins of fertile and infertile men analyzed by two-dimensional electrophoresis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.157, p.1528-33, 1987.
- BAAS, J.W., MOLAN, P.C., SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **J. Reprod.**

Fertil., v.68, p.275-80, 1983.

BARRIER-BATTUT, I., DELAJARRAUD, H., LEGRAND, E., BRUYAS, J.F., FIÉNI, F., TAINURIER, D., THORIN, C., POULIQUEN, H. Calcium, magnesium, copper, and zinc in seminal plasma of fertile stallions, and their relationship with semen freezability.

Theriogenology, v.58, p.229-32, 2002.

BARTLETT, D.J. Biochemical characteristics of dog semen. **Nature**, v.182, n.4649, p.1605-6, 1958.

BARTLETT, D.J. Studies on dog semen. II – Biochemical characteristics. **J. Reprod. Fertil.**, v.3, n.2, p.190-205, 1962.

BATTERSBY, S., CHANDLER, J.A. Correlation between elemental composition and motility of human spermatozoa. **Fertil. Steril.**, v.28, n.5, p.557-61, 1977.

BELLIN, M., HAWKINS, E., OYARZO, J., VANDEBOOM, R., AX, R. Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **J. Anim. Sci.**, v.74, p.173-82, 1996.

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

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. In: VII SYMPOSIO INTERNATIONALE DE ZOOTECHIA, 1972, Milão. **Proceedings ... Milão: Itália, 1972. p.125-39.**

- BOLLAG, D.M., ROZYCKI, M.D., EDELSTEIN, S.J. Gel electrophoresis under denaturing conditions In: ____ (Eds). **Protein Methods**. New York: Wiley-Liss, 1996, p.107-54.
- BRANDON, C.I., HEUSNER, G.L., CAUDLE, A.B., FAYRER-HOSKEN, R.A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v.52, p.863-73, 1999.
- 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. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, v.31, n.1, p.13-7, 1979.
- CALVETE, J., SANZ, L., REINERT, M., DOSTALOVA, Z., TOPFER-PETERSEN, E. Heparin-binding proteins on bull, boar, stallion, and human spermatozoa. **Mem. Mus. Nat. Hist. Nat.**, v.166, p.515-24, 1995. (Abstract)
- CALVETE, J., DOSTALOVA, Z., SANZ, L., ADERMAN, K., THOLE, H., TOPFER-PETERSEN, E. Mapping the heparin-binding domain of boar spermadhesins. **FEBS Letters**, v.379, p.207-11, 1996.
- CANCEL, A.M., CHAPMAN, D.A., KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility associated protein in Holstein bull. **Biol. Reprod.**, v.57, p.1293-301, 1997.
- CHANDONNET, L., ROBERTS, K.D., CHAPDELAINE, A., MANJUNATH, P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma.

- Mol. Reprod. Dev.**, v.26, p.313-8, 1990.
- COETZEE, K., KRUGE, T.F., LOMBARD, C.J. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. **Human Reprod. Update**, v.4, n.1, p.73-82, 1998.
- CRABO, B.G., ZIMMERMAN, K.J., MOORE, R., THORNBURGH, F.H. Movements of sodium and potassium into ejaculateds boar spermatozoa suspended in seminal plasma and a biological salt solution. **Biochem. Biophys. Acta**, v.444, n.3, p.875-85, 1976.
- CUNHA, I.C.N., LOPES, M.D., ZUCCARI, C.E.S.N. Padronização da técnica fluorescente para a avaliação da integridade de membranas espermáticas na espécie canina. In: XV CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 1996, Campo Grande. **Proceedings ...** Mato Grosso: Brasil, 1996. p.411.
- DORFMAN, M., BARSANTI, J. Diseases of canine prostate gland. **Comp. Contin. Educ. – Small An.**, v.17, p.791-811, 1995.
- DOTT, H.M., HARRISON, R.A.P., FOSTER, G.C.A. The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa form bull, rabbit and ram in homologus seminal and epididymal plasma. **J. Reprod. Fertil.**, p.55, p.113-24, 1979.
- DUBIEL, A. Badania elektroforetyczne plaszmy nasienia psów plodnyeh i z zaburzeniami plodnosci. **Pol. Arch. Wet.**, v.17, p.699-706, 1974.
(Abstract)
- ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E. Seminal characteristics and fertility in

- dogs. **Vet. Rec.**, v.125, n.7, p.399, 1989.
- ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E., MIDDLETON, D.J. An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. *Research Vet. Science*, v. 49, p.66-70, 1990.
- FARSTAD, W. Cubrición e inseminación artificial en el perro. In: SIMPSON, G.M., ENGLAND, G.C.W., HARVEY, M. (Eds). **Manual de reproducción y neonatología en pequeños animales**. Madrid: Harcourt, 2000, p.125-36.
- FETTEROLF, P.M., ROGERS, B.J. Prediction of human sperm penetrating ability using computerized motion parameters. **Mol. Reprod. Dev.**, v.27, p.326-31, 1990.
- FRASER, L.R. Mouse sperm capacitation "in vitro" involves loss of a surface associated inhibitory component. **J. Reprod. Fert.**, v.72, p.373-384, 1984.
- FRAZER, G.S., BUCCI, D.M. Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v.46, p.1389-402, 1996.
- FRENETTE, G., DUBÉ, J.Y., MARCOTTE, J.R. *et al.* Arginine esterase from isolated dog prostate secretory granules is fully active enzymatically. **Can. J. Physiol. Pharm.**, v.63, p.1603-7, 1985.
- GARNER, D. L., PINKEL, D., JOHNSON, L. A., PACE, M. M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biol. Reprod.**, v.34, p.127-38, 1986.

- GERENAM R.L., IRIKUDA, D., URADE, Y., EGUCHI, N., CHAPMAN, D.A., KILLIAN, G.J. Identification of a fertility associated protein in Bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D syntetase. **Biol. Reprod.**, v.58, p.826-33, 1998.
- GIRGIS, S.M., HAFIEZ, A.A., MITTAWY, B., HAMZA, K.H. Electrolyte concentration in semen. **Andrologia**, v.12, n.4, p.323-7, 1980.
- GMACHL, M., SAGAN, S., KETTER, S., KRCIL, G. The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. **FEBS Lett.**, v.336, p.545-8, 1993.
- HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, v.88, p.343-352, 1990.
- HOE, F.G.H., SOUZA, F.F. de, TRINCA, L., LOPES, M.D. Efeito do diluidor sobre a viabilidade das células espermáticas caninas, mantidas à 37°C. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.25, n.1, p.466-7, 2001.
- HOLT, W.V., MOORE, H.D.M., HILLIER, S.G. Computer-assisted measurement of sperm swimming speed in human semen: correlation of results with *in vitro* fertilization assays. **Fertil. Steril.**, v.44, p.112-9, 1985.
- INAMASSU, A., UECHI, E., LOPES, M.D. Viabilização do teste hiposmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Rev. Bras. Reprod. An.**, v.23, p.302-304, 1999.
- ISAACS, J. T., ISAACS, W. B., WHEATON, L. G., COFFEY, D. S.

- Differential effects of estrogens treatment on canine seminal plasma components. **Invest. Urol.**, v.17, p.495-8, 1980.
- ISAACS, W.B., SHAPER, J.H. Immunological localization and quantification of the androgen-dependent secretory protease of the canine prostate. **Endocrinology**, v.117, n.4, p.1512-20, 1985.
- IVANOVA-KICHEVA, M.G., BOBADOV, N., SOMLEV, B. Cryopreservation canine semen in pellets and in 5 mL aluminum tubes using three extenders. **Theriogenology**, v.48, p.1343-9, 1997.
- JAMES, R.W., HEYWOOD, R., STREET, A.E. Biochemical observations on beagle dog semen. **Vet. Rec.**, v.104, p.480-2, 1979.
- JEYENDRAN, R.S., VAN DER VEN, H.H., PEREZ-PELAEZ, M. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fertil.**, v.47, p.219-228, 1984.
- JOHNSTON, L.A., LACY, R.C. Genome resource banking for species conservation: selection of sperm donors. **Cryobiology**, v.32, p.68-77, 1995.
- JOHNSTON, S.D. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. **Vet. Clin. North Am.**, v.21, p.545-551, 1991.
- JOHNSTON, S.D., ROOT KUSTRITZ, M.V., OLSON, P.N.S. Breeding management and artificial insemination of the bitch. In: _____. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001, p.41-65.

- JONES, J.M., BAVISTER, B.D. Acidification of intracellular pH in bovine spermatozoa suppresses motility and extends viable life. **J. Androl.**, v.21, n.5, p.616-24, 2000.
- KANWAR, K.C., YANAMACHI, R., LOPATA, A. Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa. **Fertil. Steril.**, v.31, n.3, p.321-7, 1979.
- KARAGIANNIDIS, A. The distribution of calcium in bovine spermatozoa and seminal plasma in relation to cold shock. **J. Reprod. Fertil.**, v.46, n.1, p.83-90, 1976.
- KATSKA, L., RYNSKA, B., SMORAG, Z. Effect of seminal plasma on the *in vitro* fertilizability of bull spermatozoa. **Anim. Reprod. Sc.**, v.44, p.23-31, 1996.
- KIHLSTRÖM, J.E. Steroid hormones and the fern-like crystal pattern in air dried samples rabbit seminal plasma. **Acta Endocrinol. (Kbh)**, v.70, p.360-4, 1972.
- KILIÇ, S., SARICA, K., YAMAN, O., SOYGÜR, T., GÖGÜS, O., YAMAN, L.S. Effect of total and ionized calcium levels of seminal fluid on sperm motility. **Urol. Int.**, v.56, p.215-8, 1996.
- KILLIAN, G.J., CHAPMAN, D.A., ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biol. Reprod.**, v.49, p.1202-7, 1993.
- KINSON, G.A., NARBAITZ, R., BRUCE, N. Gonadal function following vasectomy in the rat. **Int. J. Fertil.**, v.22, n.1, p.52-5, 1977.

- KJAESTAD, H., ROPSTAD, E., ANDERSEN BERG, K. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. **Acta Vet. Scand.**, v.34, p.299-303, 1993.
- KOTARI, L.K., MISHRA, P. Histochemical changes in the testis epididymis after vasectomy. **Int. J. Fertil.**, v.18, p.119-25, 1973.
- KUMAR, S., YING, Y.K., HONG, P., MADDAIAH, V.T. Potassium increases intracellular calcium simulating progesterone action in human sperm. **Arch. Androl.**, v.44, n.2, p.93-101, 2000.
- KUMI-DIAKA, J., BADTRAM, G. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. **Theriogenology**, v.41, p.1355-1366, 1994.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-5, 1970.
- LARSON, B.L., SALISBURY, G.W. The proteins of bovine seminal plasma. 1. Preliminary and electrophoretic studies. **J. Biol. Chem.**, v.206, p.741-9, 1954.
- LIN, M., MORSHEDI, M., SRISOMBUT, C. et al. Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of the hypoosmotic swelling test, the water test, and eosin-Y staining. **Fertil. Steril.**, v.70, p.1148-1155, 1998.
- MANJUNATH, P., MARCEL, Y.L., UMA, J., SEIDAH, N.G., CHRETIEN, M., CHAPDELAINE, A. Apolipoprotein A-1 binds to a family of bovine

- seminal plasma proteins. **J. Biol. Chem.**, v.264, p.16853-7, 1989.
- MANJUNATH, P., CHANDONNET, L., BAILLARGEON, L., ROBERTS, K.D. The calmodulin-binding proteins of bovine semen. **J. Reprod. Fertil.**, v.97, p.75-81, 1993a.
- MANJUNATH, P., CHANDONNET, L., LEBLOND, E., DESNOYERS, L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v.49, p.27-37, 1993b.
- MANN, T., MANN, C.L. Vas deferens and vasectomy. In: ____ **Male reproduction function and semen**. New York: Springer-Verlag, 1981. p.161-70.
- MARTINS, M.I.M., SOUZA, F.F. de, LOPES, M.D. Eletroforese das proteínas do fluído epididimal canino: Dados preliminares. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.26, n.2, p.72-5, 2002.
- McENTEE, M., ISAACS, W., SMITH, C. Adenocarcinoma of the canine prostate: immunohistochemical examination for secretory antigens. **Prostate**, v.11, p.163-70, 1987.
- MEYERS, S.A., YUDIN, A.I., CHERR, G.N., VANDE VOORT, C.A., MYLES, D.G., PRIMAKOFF, P., OVERSTREET, J.W. Hyaluronidase activity of macaque sperm assessed by an in vitro cumulus penetration assay. **Mol. Reprod. Dev.**, v.46, p.392-400, 1997.
- MILLER, D.J., WINER, M.A., AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biol. Reprod.**, v.42, p.899-915, 1990.

- MOHANACHANDRAN NAIR, S.R., KALATHARAN, J., RAMAN, K.S.
Evaluation of canine frozen semen by hypo-osmotic swelling test.
Indian J. Anim. Sc., v.68, p.1179-1180, 1998.
- MOORE, H.D.M., HIBBIT, K.G. The binding of labeled basic proteins by boar spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.46, p.71-6, 1976.
- MOREAU, R., MANJUNATH, P. Characterization of lipid efflux particles generated by seminal phospholipid-binding proteins. **Bioch. Bioph. Acta**, v.1438, p.175-84, 1999.
- MYLES, D.G., KOPPEL, D.E., PRIMAKOFF, P. Sperm surface domains and fertilization. Fertilization in mammals. In: SERONO SYMPOSIA, 1990, New York. **Proceedings ...** New York: USA, 1990. p.169-77.
- NAABY-HANSEN, S., FLICKINGER, C.J., HERR, J.C. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v.56, p.771-87, 1997.
- NAIK, V.K., THAKUR, A.N., SHETH, A.R., JOSHI, U.M., RAO, S.S., PARDANANI, D.S., KULSRESHTHA, J.K., HANDA, R.K. The effect of vasectomy on pituitary-gonadal function in men. **J. Reprod. Fertil.**, v.48, p.441-2, 1976.
- NEILD, D., CHAVES, G., FLORES, M. et al. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.51, p.721-727, 1999.
- OEHNINGER, S., ACOSTA, A.A., MORSHEDI, M. VEECK, L., SWANSON, R.J., SIMMONS, K., ROSENWALKS, Z. Corrective measures and pregnancy outcome in in vitro fertilization in patients with

- severe sperm morphology abnormalities. **Fertil. Steril.**, v.50, n.2, p.283-7, 1988.
- OETTLÉ, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47, p.257-60, 1993.
- 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. (Abstract)
- PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A., BICUDO, S.D., LOPES, M.D., RAMIRES, P.R.N. Coloração espermática, segundo KARRAS modificada pelo emprego do Barbatimão (*Stryphnodendrum barbatiman*). In: V CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOLOGIA CELULAR, III CONGRESSO IBERO-AMERICANO DE BIOLOGIA CELULAR, 1986, Rio de Janeiro. **Proceedings ...** Rio de Janeiro: Brasil, 1986.
- PIERREPOINT, C.G., DAVIES, P., LEWIS, M.H., MOFFATT, D.B. Examination of the hypothesis that a direct control system exists for the prostate and seminal vesicles. **J. Reprod. Fertil.**, v.44, p.395-409, 1975.
- PRIMAKOFF, P., WOODMAN-GAMER, L., TUNG, K.S.K., MYLES, D.G. Reversible contraceptive effect of PH-20 immunization in male guinea pigs. **Biol. Reprod.**, v.56, p.1142-6, 1997.
- QUINLIVAN, W.L.G. The effect of temperature on the proteins of human

- seminal plasma during storage. **Fertil. Steril.**, v.23, n.3, p.163-7, 1972.
- QUINN, P.J., WHITE, I.G., WIRRICK, B.R. Studies of the distribution of the major cations in semen and male accessory secretions. **J. Reprod. Fertil.**, v.18, p.209-12, 1965.
- REINERT, M., CALVETE, J., SANZ, L., TOPFER-PETERSEN, E. Immunohistochemical localization in the stallion genital tract, na topography on spermatozoa of seminal plasma protein SSP-7, a member of the spermadhesin protein family. **Andrologia**, v.29, p.179-86, 1997.
- RENTON, J.P., HARVEY, M.J.A., HARKER, S. A spermatozoal abnormality in dogs related to infertility. **Vet. Rec.**, v.118, p.429-30, 1986.
- REVELL, S.G., MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.36, p.200-203, 1994.
- ROBLERO, L., GUADARRAMA, A., ORTIZ, M.E., FERNÁNDEZ, E., ZEGERS-HOCHSCHILD, F. High potassium concentration improves the rate of acrossome reaction in human spermatozoa. **Fertil. Steril.**, v.49, n.4, p.676-9, 1988.
- RODRIGUES, B.A., DONÁ, A.V., RODRIGUES, J.L. Influência da secreção prostática autóloga sobre a viabilidade de espermatozóides caninos no pós-descogelamento. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.36, n.6, p.316-23, 1999.
- RODRIGUEZ-GIL, J.E., MONTSERRAT, A., RIGAU, T. Effects of

- hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.42, n.5, p.815-29, 1994.
- RONCOLETTA, M. **Perfil eletroforético das proteínas de membrana de espermatozóides e plasma seminal, relacionados com a congelabilidade do sêmen de touros**. Jaboticabal, 1999. 154p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- RONCOLETTA, M., MORANI, E.S.C., FRANCHESCHINIM P.H. 14 kDa seminal plasma protein identification and its relation with Bull semen freezability. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2002, Foz do Iguaçu. **Proceedings ... Paraná, Brasil, 2002**.
- ROSZEL, J.F. Anatomy of the canine uterine cervix. **Comp. Contin. Educ. Prat. Vet.**, v.14, p.751-61, 1992.
- ROTA, A., STRÖM, B., LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. **Theriogenology**, v.44, p.885-900, 1995.
- SANCHEZ-PARTIDA, L.G., WINDSOR, D.P., EPPLESTON, J., SETCHELL, B.P., MAXWELL, W.M. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. **J. Androl.**, v.20, p.280-8, 1999.
- SAUBER, K., FORISTALL, K., BALL, B.A. Characterization of PH-20 in

- canine spermatozoa and testis. **Theriogenology**, v.57, p.977-87, 2002.
- SEAGER, S.W.J., PLATZ, C.C. Artificial insemination and frozen semen in the dog. **Vet. Clin. North Amer.**, v.7, p.757-64, 1977.
- SHABANOWITZ, R.B., KILLIAN, G.J. Two-dimensional electrophoresis of proteins in principal cells, spermatozoa, and fluid associated with the rat epididymis. **Biol. Reprod.**, v.36, p.753-68, 1987.
- SILVA, L.D.M., ONCLIN, K., DONNAY, I., VERSTEGEN, J. Laparoscopic vasectomy in the male dog. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47, p.399-401, 1993.
- SÖDERQUIST, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., JANSON, L. Post-thaw motility, ATP content and cytochrome C oxidase activity of AI bull spermatozoa in relation to fertility. **J. Vet. Med. Assoc.**, v.38, p.165-74, 1991.
- SOUZA, F.F. de, LOPES, M.D. Massa molar das proteínas do plasma seminal canino: dados preliminares. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.26, n.2, p.75-7, 2002.
- SOUZA, F.F. de, RODRIGUES, A.L.R., TUTIDA, L., BICUDO, S.D. Efeito de dez colheitas sucessivas de sêmen sobre a concentração de proteínas totais do plasma seminal de carneiros. In: II CONGRESO LATINOAMERICANO DE ESPECIALISTAS EM PEQUEÑOS RUMINANTES Y CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS Y EL XI CONGRESO NACIONAL DE OVINOCULTURA, 2001, Mérida. **Proceedings ...** Yucatán, México, 2001.

- 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. Anim. Sci.*, v.32, p.181-6, 1995.
- STUBBS, A.J., RESNICK, M.I. Proetin electrophoresis patterns of canine prostatic fluid – Effect of hormonal manipulation. *Invest. Urol.*, v.16, n.3, p.175-8, 1978.
- TARDIF, S., LAFOREST, J.P., CORMIER, N., BAILEY, J.L. The importance of porcine sperm parameters on fertility *in vivo*. *Theriogenology*, v.52, p.447-59, 1999.
- TULSIANI, D.R.P., YOSHIDA-KOMIYA, H., ARAKI, Y. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol. Reprod.*, v.57, p.487-94, 1997.
- URRY, R.L., DOUGHERTY, K.A., COCKETT, A.T.K. Vasectomy and vasovasostomy. I. Timing of histologic changes in immature and mature dog testis after vasectomy. *Fertil. Steril.*, v.27, n.8, p.937-44, 1976.
- VARE, A.M., BANSAL, P.C. Changes in the canine testes after bilateral vasectomy – an experimental study. *Fertil. Steril.*, v.24, p.793-7, 1973.
- VASQUEZ, J.M., MARTINEZ, E.A., MARTINEZ, P. et al. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other for analysing the sperm membrane. *Theriogenology*, v.47, p.913-922, 1997.
- VERDEJO, A.J., ALBORNOZ, E.O.C., MALDONADO, A.L., VERDEJO, J.J., GÓMEZ, A.Z. Estudio comparativo de determinados aprámetros bioquímicos en semen de sujetos vasectomizados y no

- vasectomizados. **Arch. Esp. Urol.**, v.51, n.8, p.811-7, 1998.
- VERSTEGEN, J., IGUER-OUAFA, M., ONCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2002, Foz do Iguaçu. **Proceedings ...** Paraná: Brasil, 2002. p.149-79.
- WALES, R.G., WHITE, I.G. Some observations on the chemistry of dog semen. **J. Reprod. Fertil.**, v.9, n.1, p.69-77, 1965.
- WEISKE, W.H. Vasectomy. **Andrologia**, v.33, n.3, p.125-34, 2001.
- WITE, I.G. Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S E. (Eds). **Reprodução animal**. 4ªed., São Paulo: Manole, 1988, p.212-28.
- ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999, 663p.
- ZHANG, B.R., LARSSON, B., LUNDEHEIM, N., HÅÅR, M.G.H., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Prediction of Bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed sêmen from Young dairy bulls entering an AI-program. **Int. J. Androl.**, v.22, p.253-60, 1999.

SOUZA, F.F. de **Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise bioquímica do plasma seminal canino**. Botucatu. 2003. 102p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP.

RESUMO

Neste estudo foram utilizados 20 cães, sem raça definida, de fertilidade desconhecida, com pesos variando entre 15 e 20 Kg, sorologicamente negativos para leptospirose e brucelose canina. Após um período de condicionamento, foram colhidos seis ejaculados de cada cão, por manipulação digital do pênis, sendo três antes da deferentectomia e três após. O sêmen foi imediatamente analisado após a colheita, considerando os seguintes parâmetros: volume, cor, motilidade progressiva, vigor espermático, porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais, pH, integridade de membrana (teste hiposmótico e coloração com sondas fluorescentes). Foram determinadas as concentrações de proteínas totais, cloretos totais, cálcio, potássio e sódio. A SDS-PAGE foi realizada utilizando-se duas concentrações de poliácridamida, 13% e 22%, no gel de separação. Os géis foram corados com coomassie azul brilhante R-250, suas imagens digitalizadas e avaliadas num programa analisador de imagens, onde foram estimados os pesos moleculares e a densidade óptica integrada de cada banda, para cada amostra. Uma correlação negativa foi verificada entre o potássio e a motilidade progressiva, vigor espermático, resultados do teste hiposmótico e porcentagem de espermatozóides com integridade de membrana na coloração com sondas fluorescentes. Apenas o cálcio mostrou-se significativamente mais elevado após a deferentectomia. Foi verificado um total de 37 bandas antes da deferentectomia e 35 após. Antes da deferentectomia, encontrou-se uma correlação positiva e significativa entre duas bandas protéicas, B4 (67 kDa) e a B5 (58,6 kDa) e a motilidade progressiva, vigor espermático, porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais, resultados do teste hiposmótico e porcentagem de espermatozóides com integridade de membrana na coloração com sondas fluorescentes. Apenas três bandas foram significativamente diferentes antes e após a deferentectomia (B3, de 73,5 kDa, B29, de 7,8 kDa e B27, de 3,6 kDa).

Palavras-chave: Cão; Plasma seminal; Proteínas; Eletroforese, Eletrólitos.

SOUZA, F.F. de **Electrophoresis characterization of protein profile and biochemistry analysis of canine seminal plasma**. Botucatu. 2003. 102p. Thesis (PhD in Veterinary Medicine, Animal Reproduction) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Câmpus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP.

ABSTRACT

In this study 20 mixed breed dogs (15 to 20 Kg of body weight) of unknown fertility were used. The dogs were negative in leptospirosis and brucellosis tests. After a conditioning time, were collected six ejaculated of each dog by digital manipulation of penis, being three before and three after deferentectomy. Immediately, the semen was analyzed considering the following parameters: volume, color, spermatoc motility, vigor, morphological forms of the spermatozoa, pH and membrane integrity (hypoosmotic test and fluorescent stain). The concentrations of total proteins, total chlorides, calcium, potassium and sodium were determined. The SDS-PAGE of each seminal plasma sample was carried out using two polyacrylamide concentrations, 13% and 22%, in the separation gel. The gels were stained with coomassie blue brilliant R-250, the images were digitalized and evaluated in a analyzer software, where the molecular weights were estimated, in accordance with a standard applied in each gel. The integrated optic density of each band for each sample was determined. A negative correlation was verified between the potassium and the spermatoc motility, vigor, results of the hypoosmotic test and percentage of spermatozoa with integrity of membrane in the fluorescent stain. The calcium concentrations after of deferentectomy were significantly higher than before. A total of 37 bands before deferentectomy and 35 after were observed. Before the deferentectomy, a positive correlation was verified between two bands, B4 (67 kDa) and the B5 (58,6 kDa), and the spermatoc motility, vigor, percentage of normal spermatozoa, results of the hypoosmotic test and percentage of spermatozoa with integrity of membrane in the stain fluorescent. Three bands were significantly different before and after the deferentectomy (B3, of 73,5 kDa, B29, of 7,8 kDa and B27, 3,6 kDa).

Keywords: Dog; Seminal Plasma; Proteins; Electrophoresis, Electrolites.