

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E
CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO DO PLASMA
SEMINAL DE CÃES (*Canis familiaris* – LINNAEUS, 1758) COM
HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA, TRATADOS COM
TOXINA BOTULÍNICA A.**

Tathiana Ferguson Motheo

Orientador: Professor Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária (Área de Concentração em Cirurgia Veterinária)

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2009

M918a Motheo, Tathiana Ferguson
Avaliação dos parâmetros espermáticos e caracterização do perfil bioquímico do plasma seminal de cães (*Canis familiaris* – LINNAEUS, 1758) com hiperplasia prostática benigna, tratados com toxina botulínica A / Tathiana Ferguson Motheo. - - Jaboticabal, 2009

xvii, 92 f : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente
Banca examinadora: Maria Denise Lopes, Fabiana Ferreira de Souza
Bibliografia

1. Toxina botulínica. 2. Plasma seminal. 3. Cão. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Tathiana Ferguson Motheo – nascida na cidade de Rio Claro, São Paulo, aos 21 de Outubro de 1980, filha de Artur de Jesus Motheo e Angela Maria Ferguson Cavichioli Motheo. Graduou-se em Janeiro de 2005 pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Jaboticabal. Fez parte do programa de aprimoramento (residência) na área de Reprodução e Obstetrícia Veterinária também pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal no período compreendido entre março de 2005 e fevereiro de 2007. Ingressou no mestrado pelo Programa de pós-graduação em Cirurgia Veterinária, em Março de 2007, na mesma instituição e obteve bolsa junto à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo – FAPESP.

*"A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo modo
que seus animais são tratados. "*

Mahatma Ghandi

Dedico

Aos meus pais Artur e Angela, que sempre com um apoio incondicional, cada um da sua maneira, me incentivam e me auxiliam sempre.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me guiado ao longo de todo este período e por ter me dado calma e serenidade nas horas mais difíceis do meu mestrado.

Aos meus pais Artur e Angela por todo apoio, incentivo e carinho. Muito obrigado por terem feito de mim a pessoa que sou hoje. Espero um dia poder retribuir tudo o que vocês fizeram por mim.

Aos meus irmãos caçulas Stéphanie e Arthur, vocês são a alegria da minha vida. Gordinhos, amo vocês!

Ao meu irmão Daniel que apesar do distanciamento, você é e sempre será meu irmão mais velho, super protetor e companheiro de todas as travessuras de infância.

Ao meu namorado Alexandre Pinto Ribeiro (Dedo), pelo carinho, companheirismo, risadas, ensinamentos em facoemulsificação e pelas estatísticas. Mesmo sendo cabeça dura e teimoso, quero ficar velhinha ao seu lado... amo você!

Ao meu professor e orientador professor Wilter Ricardo Russiano Vicente, pela confiança, orientação, amizade e “puxões de orelha”. Obrigado por todos esses anos de aprendizado e orientação.

A professora Maria Denise Lopes que mesmo não me conhecendo direito, disponibilizou o seu laboratório para a realização da fase final do meu experimento. Meus sinceros agradecimentos pela acolhida, pelo carinho, pela confiança e pela orientação.

Á minha “pseudo-orientadora” Fabiana Ferreira de Souza, pela calma, paciência, amizade e bom humor durante a fase “eletroforética” do experimento. Sem dúvida sua ajuda foi essencial para a realização desta etapa.

Aos meus queridos amigos “obstetras”, em especial aos integrantes do quarteto, Ara, Maricy e Giu por toda amizade, companheirismo, discussões (no bom sentido) e bom humor. Com certeza ainda teremos muitos experimentos juntos.

As minhas amigas e irmãs de república Marcy, Sofia, Caroline, Mariana, Ana Paula por todos os momentos de descontração, lamentações e desabafos. Vocês moram no meu coração, aêêê!

Ao pessoal do Departamento de Reprodução Animal, Isabel, Roberta, Ivo e Edson que me auxiliaram muito durante todo o período do mestrado

A todos do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ Unesp Botucatu por terem me agüentado por cinco meses... Obrigado por tudo!

A todos os animais do meu experimento, que mesmo sem saber o que estavam fazendo com eles, estes deram a sua contribuição para o desenvolvimento desta pesquisa.

E por fim, mas não menos importante, à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela a concessão da bolsa e do auxílio à pesquisa.

Sumário

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 - Anatomia, histologia e fisiologia prostática	2
2.2 - Hiperplasia prostática benigna (HPB)	4
2.3 - Neurotoxina botulínica tipo A	13
2.4 - Métodos de avaliação da fertilidade	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 - Animais e grupos experimentais	31
3.2 - Toxina botulínica tipo A	32
3.2.1 – Diluição	32
3.2.2 – Injeção de toxina botulínica do tipo A e de solução fisiológica de NaCl 0,9%	32
3.3 - Colheita de sêmen	34
3.4 – Análises físicas e morfológicas do sêmen	35
3.4.1 – Análises macroscópicas	35
3.4.2 – Análises microscópicas	36
3.4.2.1 – Motilidade, vigor e concentração espermática ..	36
3.4.2.2 – Morfologia espermática	36
3.4.2.3 – Avaliação das membrana plasmática	37
3.4.2.3.1 – Teste hiposmótico	37
3.4.2.3.2 - Coloração por sondas Fluorescentes	37

3.5 - Análise bioquímica do plasma seminal	38
3.5.1 - Proteínas totais	38
3.5.2 - Cloretos totais	38
3.5.3 - Cálcio	38
3.5.4 - Potássio	39
3.5.5 - Sódio	39
3.5.6 - pH	39
3.5.7- Análises das proteínas do plasma seminal.....	39
3.6 - Análise estatística.....	42
4. RESULTADOS	43
4.1 – Avaliação dos parâmetros espermáticos	43
4.2 – Avaliação da morfologia espermática	44
4.3 – Avaliação da integridade de membrana plasmática.....	46
4.3.1 – Teste hiposmótico	46
4.3.2 – Coloração por sondas fluorescentes	47
4.4 – Avaliação bioquímica do plasma seminal	49
4.4.1 - Dosagens de proteínas totais, cloretos totais, cálcio, potássio e sódio	49
4.4.2 – Mensuração do pH	52
4.5 - Perfil eletroforético	53
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS	66
8. APÊNDICE	88

LISTA DE ABREVIATURAS

CMA	Acetato do clomadinona
DES	Dietilestilbrestol
DHT	Diidrotestosterona
ECP	Cipionato de estradiol
FDA	Food and Drug administration
H	Cadeia pesada da toxina botulínica A
H _C	Porção C-terminal da cadeia pesada da toxina botulínica A
H _N	Porção N-terminal da cadeia pesada da toxina botulínica A
HPB	Hiperplasia prostática benigna
IPSS	Escore internacional de sintomas prostáticos
KGF	Fator de crescimento de ceratinócitos
TGF- β	Fator transformador de crescimento β
L	Cadeia leve da toxina botulínica A
NSF	N-etilmaleimida
PSA	Antígeno prostático específico
SNAP-25	Proteína sinaptossomal de peso molecular de 25 kDa
SNARE	Soluble NSF-attachment protein receptor
TB-A	Toxina botulínica do tipo A
TZP -4238	17 α - acetoxy-6-chloro-2-oxa-4,6 pregnadiene-3,20 dione
VAMP	Proteína de membrana associada à vesícula
WIN-49596	Zanoterone
IP	Iodeto de propídeo
DIC	Diacetato 6-carboxifluoresceína
MP	Motilidade progressiva
KA	Coloração de Karras
HO	Teste hiposmótico
GAGS	Glicosaminoglicanos
FAA	Fertility Associated Antigen”
BSPs	Bovine seminal plasma proteins

CPSE	Proteína específica prostática canina
SPs	Proteínas do plasma seminal eqüino
kDa	KiloDalton
IOD	Densidade óptica integrada

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1.	Componentes dos géis de separação de poliacrilamida na concentração de 12 e 18% para a eletroforese SDS-PAGE.	40
Tabela 2.	Componentes do gel de empilhamento de poliacrilamida na concentração de 5% para a eletroforese SDS-PAGE	41
Tabela 3.	Média e erro padrão da média do volume (mL), motilidade (%) e vigor espermático de cães do grupo controle e dos grupos I e II, em todos os períodos avaliados, em todos os períodos avaliados. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.	43
Tabela 4.	Média e erro padrão da média da concentração espermática ($\times 10^6$ por ejaculado) realizada em cães dos grupos controle, I e II, em todos os períodos avaliados. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009	44
Tabela 5.	Média e erro padrão da média da morfologia espermática dos cães do grupo controle e dos grupos I e II, em todos os períodos avaliados. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.	46
Tabela 6.	Média e erro padrão da média do teste hiposmótico realizado nos animais dos grupos controle, I e II, em todos os períodos avaliados. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009	47
Tabela 7.	Média e erro padrão da média dos espermatozoides corados pela coloração de sondas fluorescentes [diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e iodeto de propídeo (IP)] dos cães do grupo controle e dos grupos I e II, em todos os períodos avaliados. FCAV- Unesp Jaboticabal SP, 2009.	48

Tabela 8.	Média e erro padrão da média* dos valores de proteína total (g/dL) do plasma seminal de cães em todos os grupos estudados, em diferentes períodos. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009..	49
Tabela 9.	Média e erro padrão da média dos valores de cloretos totais (mmol/dL) do plasma seminal de cães em todos os grupos estudados, em diferentes períodos. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.	50
Tabela 10.	Média e erro padrão da média dos valores de cálcio (mmol/dL) do plasma seminal de cães em todos os grupos estudados, em diferentes períodos. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.	50
Tabela 11.	Média e erro padrão da média dos valores de potássio (mmol/dL) do plasma seminal de cães em todos os grupos estudados, em diferentes períodos. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.	51
Tabela 12.	Média e erro padrão da média* dos valores de sódio (mmol/dL) do plasma seminal de cães em todos os grupos estudados, em diferentes períodos. Jaboticabal - SP, 2009.	51
Tabela 13.	Média e erro padrão da média dos valores de pH do plasma seminal de cães em todos os grupos estudados, em diferentes períodos. Jaboticabal - SP, 2009.	52
Tabela 14.	Médias da densidade óptica integrada (IOD) das bandas protéicas e seus pesos moleculares (kDa) detectadas no gel de separação de 12% do plasma seminal dos cães dos grupos controle, I e II, nos momentos pré-aplicação (Pa), 2, 4 e 8 semanas após a injeção de solução salina de NaCl a 0,9% ou de toxina botulínica do tipo A. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.	54

Tabela 15.	Médias da densidade óptica integrada (IOD) das bandas protéicas e seus pesos moleculares (kDa) detectadas no gel de separação de 18% do plasma seminal dos cães dos grupos controle, I e II, nos momentos pré-aplicação (Pa), 2, 4 e 8 semanas após a injeção de solução salina de NaCl a 0,9% ou de toxina botulínica do tipo A.. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.	55
Tabela 16.	Média e erro padrão da média dos valores da densidade óptica (IOD) da banda de 15,2 kDa do plasma seminal de cães em todos os grupos estudados, em diferentes períodos. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.	58

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura da toxina botulínica e suas respectivas subunidades (Adaptado de www.btxa.com . Data de acesso 14/12/2008).	14
Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação da Toxina Botulínica A (Adaptado de www.btxa.com)	17
Figura 3. Representação esquemática da denervação química produzida pela toxina botulínica do tipo A. A. Repleção das vesículas sinápticas. B. Desenvolvimento de brotamentos axonais, oriundos da terminação nervosa original. C. Junção neuro-muscular parcialmente restaurada. D. Involução dos brotamentos e recuperação do terminal nervoso. E. Restabelecimento da transmissão nervosa normal (Adaptado de www.btxa.com)	18
Figura 4. Imagem ultrassonográfica do corte transversal (A) e corte longitudinal (B e C) da glândula prostática. Corte transversal da próstata evidenciando a penetração da agulha (seta) e deposição da solução de TB-A no parênquima prostático (*)	34
Figura 5. Fotografia evidenciando o material utilizado para colheita de sêmen (A) e método da mão enluvada (B).	35
Figura 6. Espermatozóides normais, sem alterações morfológicas, corados pela coloração de Karras (KA) modificado por PAPA et al. (1986) (A). Células espermáticas com acrossomo destacado (*) e cauda fortemente dobrada (seta), corados pela coloração de Karras (KA) modificado por PAPA et al. (1986) (B).	45

Figura 7.	Média e erro padrão da média da coloração por sondas fluorescentes, com os corantes diacetato de carboxifluoresceína (preto) e iodeto de propídeo (branco) dos cães do grupo controle e dos grupos I e II, em todos os períodos avaliados. Jaboticabal - SP, 2009.	48
Figura 8.	Imagem do gel de separação a 12% de poliacrilamida, evidenciando as bandas protéicas presentes em cada amostra (colunas)	55
Figura 9	Imagem do gel de separação de 12% de poliacrilamida, no momento da análise pelo software Image Master, evidenciando a coluna do marcador (azul claro), com seus respectivos pesos moleculares (kDa) e as demais colunas com a marcação de cada banda (quadrado azul).	55
Figura 10.	Imagem do gel de separação de 18% de poliacrilamida, evidenciando as bandas protéicas presentes em cada amostra (colunas)	56
Figura 11.	Imagem do gel de separação de 18% de poliacrilamida no momento da análise pelo software Image Master, evidenciando a coluna do marcador (azul claro), com seus respectivos pesos moleculares (kDa) e as demais colunas com a marcação de cada banda (quadrado azul).	56
Figura 12.	Média e erro padrão da média* dos valores da densidade óptica (IOD) da banda de 15,2 kDa do plasma seminal de cães em todos os grupos estudados, em diferentes períodos. Jaboticabal - SP, 2009	58

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E CARACTERIZAÇÃO DO
PERFIL BIOQUÍMICO DO PLASMA SEMINAL DE CÃES (*Canis familiaris* –
LINNAEUS, 1758) COM HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA, TRATADOS COM
TOXINA BOTULÍNICA A.**

Resumo - Atualmente, estudos têm demonstrado a utilização da toxina botulínica do tipo A (TB-A) no tratamento de afecções prostáticas, como a hiperplasia prostática benigna. Ainda, sabe-se que alguns componentes bioquímicos do plasma seminal são relativamente específicos para a regulação da função espermática. O objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos deletérios ou benéficos da TB-A sobre a fertilidade de cães com HPB. Foram utilizados 18 cães machos, sem raça definida com sinais de HPB. Os animais foram divididos ao acaso em 3 grupos de 6 cães que receberam injeção intraprostática de solução salina de NaCl 0,9% (GC), solução contendo 250U (GI) e 500U de TB-A (GII). Quatro amostras foram colhidas antes da aplicação e 2, 4 e 8 semanas após o tratamento. Foi mensurado o pH e dosadas as concentrações de proteína total, cloretos totais, cálcio, potássio e sódio das amostras de plasma seminal. Ainda, foi realizada eletroforese SDS-Page utilizando géis de poliacrilamida nas concentrações de 12 e 18%. Os resultados foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) e ao teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos avaliados. Outrossim, foram constatadas 31 bandas protéicas, com pesos moleculares variando de 106,2 a 3,9 kDa semelhantemente aos achados descritos na literatura. Destarte, pode-se concluir que os tratamentos com 250U e 500U de TB-A não alteraram os perfis bioquímico e protéico do plasma seminal de cães com HPB e, portanto podem ser considerados uma boa opção para cães destinados à reprodução ou envolvidos em programas de criopreservação de gametas.

Palavras-chave: toxina botulínica, plasma seminal, cão.

**SEMINAL PARAMETERS EVALUATION AND BIOCHEMICAL PROFILE
CHARACTERIZATION OF SEMINAL PLASMA OF DOGS (*Canis familiaris* –
LINNAEUS, 1758) WITH BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA TREATED WITH
BOTULINUM TOXIN TYPE A**

ABSTRACT - Recently, botulinum neurotoxin type A (BoNT-A) application in the lower urinary tract has been extended to prostate disorders such as benign prostatic hyperplasia (BPH). Nevertheless, sperm function is highly dependent on ionic and protein environment. The goal of the present study was to evaluate the effects of BoNT-A treatment on seminal plasma biochemical and eletrophoretic profile in dogs with BPH. Eighteen mature male mongrel dogs with BPH, were use in this study. They were randomly divided in three groups, which received intraprostatic injection of 0,9% NaCl normal saline solution (GI), 250U(GII) and 500U (GIII) of BoNT-A. All animals were previously conditioned to semen collection and four semen samples were collected before treatment and at 2, 4 and 8 weeks after injection. The semen was evaluated, and centrifuged to obtain seminal plasma for measurement of pH, total protein concentration (TP), total chlorides (TC), calcium (Ca), potassium (K), and sodium (Na). Additionally, one-dimensional sodium dodecyl sulfatopolyacrilamide gel eletrophoresis (SDS-PAGE) was carried out on 12 and 18% vertical minigel. One way ANOVA and Kruskall-Wallis with Bonferoni as a post hoc test were used to comparison of means ($P < 0.05$). Average pH, TP, TC, Ca, K did not vary significantly at any time point and among each studied group and maintained normal values for the specie. Similarly as described in the literature, the eletrophoresis analysis of the pooled eluded fractions, identified 31 bands, with molecular weights varying from 106.2 to 3.9 kDA, In conclusion, the treatment with 250U and 500U of BoNT-A did not modify the biochemical or protein profiles of the seminal plasma of dogs with BPH

Key-words: botulinum toxin, seminal plasma, dog

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida da população canina e humana, problemas relacionados à próstata vêm adquirindo extrema importância. Dentre eles, a hiperplasia benigna prostática (HPB) é a que apresenta maior ocorrência nesta espécie. O cão é o único animal doméstico que apresenta esta alteração, por isso, este pode ser considerado o melhor modelo experimental para estudos da HPB humana.

No homem, o tratamento conservativo à base de medicações é o de eleição – inúmeros fármacos são utilizados para o tratamento de HPB –, porém, apresentam efeitos colaterais indesejáveis. Em cães, a orquiectomia bilateral é o tratamento mais indicado em casos de HPB, contudo, não o é em animais sem condições de serem submetidos a um procedimento cirúrgico e em reprodutores. Em ratos, humanos e cães, a administração intraprostática de toxina botulínica A (TB-A) tem mostrado excelentes resultados na resolução dos sinais clínicos da HPB. Sendo assim, a utilização da TB-A em cães destinados à reprodução ou envolvidos em programas de criopreservação de gametas poderia ser uma alternativa no tratamento da hiperplasia prostática benigna. Entretanto, não há dados sobre os possíveis efeitos (deletérios ou não) da TB-A sobre a fertilidade no homem e em cães.

O sêmen de canino pode ser avaliado por ensaios *in vitro* capazes de definir quais os aspectos da função espermática estão alterados. Sabe-se que na tentativa de prever a fertilidade *in vivo* a combinação de diferentes ensaios mostrou resultados mais verossímeis quando comparados a um único teste. Portanto, a análise *in vitro* do sêmen e a caracterização dos perfis bioquímico e protéico do plasma seminal, são imprescindíveis para a avaliação da fertilidade em animais submetidos a esse tipo de terapia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Anatomia, histologia e fisiologia prostática

A próstata é a única glândula sexual acessória do cão, apresentando como principal função a produção de fluido prostático, que, por sua vez, fornece um ambiente propício à sobrevivência e motilidade dos espermatozoides (DORFMAN & BARSANTI, 1995; BARSANTI & FINCO, 1997; JONHSTON et al., 2001). É um órgão simétrico, de formato ovóide ou esférico, e consistência elástica. Um sulco dorsal e um septo interno dividem-no em lobos direito e esquerdo, sendo que cada um deles se subdivide em lóbulos por septos mais finos que se irradiam a partir da sua cápsula (DYCE et al., 1997). A glândula prostática é um órgão retroperitoneal que circunda completamente o colo vesical e o início da uretra dos cães (JONHSTON et al., 2001; HEDLUND et al., 2002). A porção prostática da uretra é recortada por uma crista dorsal formando o colículo seminal, que, por sua vez, marca a abertura do ducto deferente e de inúmeros ductos prostáticos responsáveis pela drenagem da glândula (DYCE et al., 1997; LATTIMER, 1998). O lume uretral apresenta-se ligeiramente dilatada no interior da próstata, porém estreita-se novamente ao se aproximar da saída da pelve acima do arco isquiático (DYCE, 1997).

Do nascimento até os dois meses de idade, época em que ocorre a degeneração do úraco vestigial, a próstata se localiza no interior do abdome; após este período, esta se desloca para cavidade pélvica (DORFMAN & BARSANTI, 1995). Com a maturidade sexual, há o aumento de tamanho dessa glândula, que na puberdade fica limitada dorsalmente pelo reto e ventralmente pela sínfise púbica ou parede abdominal. Devido à grande influência hormonal exercida sobre esta estrutura em cães no início da meia idade há, usualmente, o desenvolvimento de uma hiperplasia da porção parenquimatosa da glândula, culminando em aumento de volume desta e consequente deslocamento cranial para o abdômen. (DORFMAN & BARSANTI, 1995; DYCE et al., 1997; BASINGER et al., 1998; LATTIMER, 1998).

A localização da próstata pode sofrer alterações devido à distensão vesical, conformação do cão e alterações patológicas como neoplasias, cistos e abscessos

prostáticos. Animais obesos, com repleção vesical, ou com alterações prostáticas, podem apresentar um deslocamento dessa estrutura para o interior da cavidade abdominal, fato que deve ser considerado para a avaliação da glândula, uma vez que em animais normais a próstata ocupa menos de 50% do canal pélvico (BARSANTI & FINCO, 1997; BASINGER et al., 1998; LATTIMER, 1998).

Os suprimentos sanguíneo e nervoso da próstata se localizam nos pedículos laterais (rebatimento retroperitoneal), penetrando na glândula nas posições 30º e 60º, quando visibilizados em um plano transversal. As artérias prostáticas se originam da artéria pudenda interna (ramo da artéria ilíaca interna) e emitem ramos para o ducto deferente, uretra, bexiga, ureteres e reto (HEDLUND et al., 2002). Adicionalmente, ainda se encontram as veias uretral e prostática, que, por meio de anastomoses com a veia ilíaca interna, são responsáveis pelo retorno venoso (JOHNSTON et al., 2001).

A próstata possui dois tipos de inervação: simpática, representada pelo nervo hipogástrico, e parassimpática, representada pelo nervo pélvico. A inervação simpática promove um estímulo que desencadeia uma contração da musculatura lisa e do epitélio secretor, resultando na expulsão do fluido prostático através dos ductos prostáticos e da uretra. A inervação parassimpática também auxilia na secreção dos líquidos provenientes da próstata (FOSSUM, 2001).

Estudos realizados em cães e em humanos sugerem a existência de terminações nervosas opioidérgicas responsáveis pela regulação da perfusão vascular local e do tônus do estroma prostático (JOHNSTON et al., 2001). Segundo GKONOS et al. (1995) e KAMPA et al. (2004), os opióides estão presentes na próstata e afetam o crescimento celular por meio de ação local (produzidos por neurônios peptidérgicos e/ou células neuroendócrinas) ou por meio de ação sistêmica.

Esta glândula é responsável pela produção do fluido prostático, responsável pela geração de um ambiente propício para a sobrevivência e deslocamento dos espermatozoides durante a ejaculação. Além disso, esta estrutura participa do controle do fluxo urinário da bexiga, devido ao volume de musculatura lisa; contribui na formação do plasma seminal, fornecendo moléculas e enzimas como a fibrolisina, coagulase, e auxilia na rápida metabolização da testosterona em diidrotestosterona

(DORFMAN & BARSANTI, 1995; KUMAR & MAJUMDER, 1995; BARSANTI & FINCO, 1997).

2.2 - Hiperplasia prostática benigna (HPB)

Enfermidades prostáticas são comuns principalmente em cães idosos e não castrados. Dentre elas, a hiperplasia prostática benigna (HPB) é a que apresenta maior ocorrência. Em estudo retrospectivo realizado em 88 animais com alterações prostáticas, READ & BRYDEN (1995) relataram que 58% destas eram compatíveis com HPB. Já OLIVEIRA et al. (1996), avaliando cães encaminhados à necropsia, constataram que 84,6% dos animais apresentavam alterações nesta glândula, dentre as quais 36,9% era HPB. A HPB é uma condição espontânea e progressiva de aumento da próstata, intimamente relacionada ao envelhecimento e a alterações hormonais presente em cães e humanos (WINTER et al., 1995; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 1997; MURAKOSHI et al., 1998; SIRINARUMITR et al., 2001; SOUZA, 2004). O cão é o único animal doméstico que apresenta esta alteração, sendo assim, este é considerado o melhor modelo experimental para o estudo da HPB humana (COCHRAN et al., 1981; LAROQUE et al., 1994; PETER et al., 1995) conforme apontou-se anteriormente.

O início da HPB em cães é observado em animais com idades entre 1 a 2 anos, sendo que 16% dos cães apresentam evidências histológicas de hiperplasia (aumento no número de células) e hipertrofia (aumento do tamanho da célula) da próstata aos 2 anos de idade. Mais de 80% dos cães com 5 anos e 95% com 9 anos de idade apresentam evidências histológicas de HPB (JOHNSTON et al., 2001; SIRINARUMITR et al., 2001).

Semelhantemente, 50 a 90% dos homens apresentam a doença entre 50 a 80 anos de idade (BERRY et al., 1984; COTRAN et al., 1999; CARSON III & RITTMASER, 2003). A HPB humana é nodular, e é composta por vários tipos celulares (células musculares lisas, fibroblastos e epitélio glandular), sendo que esta alteração é caracterizada primariamente pela proliferação dos elementos que compõem o estroma da glândula, promovendo compressão da uretra. Inicialmente, o desenvolvimento da hiperplasia se dá pela proliferação de fibroblastos com posterior

envolvimento dos demais tipos celulares. Ao término do processo, os nódulos apresentam arquitetura tecidual variada, e comumente são constatadas áreas com arranjo morfológico diferente na mesma glândula (WILSON et al., 1980). Em cães, o crescimento prostático envolve principalmente os compartimentos glandulares, produzindo obstrução retal e constipação. Em cães idosos, o aumento no volume prostático é atribuído à proliferação de ambos os compartimentos, tanto o glandular como o estromal (LOWSETH et al., 1990; COHEN et al., 1995; LAROQUE et al., 1995). Entretanto, há controvérsias por parte de alguns autores, principalmente quando se relaciona este aumento à idade do animal. Em cães jovens, com média etária de 2,5 anos de idade, esta alteração apresenta maior envolvimento glandular, já em animais acima de cinco anos, ainda que não predomine, há maior envolvimento estromal (KLAUSNER et al., 1994; BARSANTI et al., 1999).

Outro motivo que gera a ocorrência de divergências em relação ao desenvolvimento de hiperplasia glandular, estromal ou dos dois compartimentos está no fato de que a mesma próstata pode apresentar alterações variadas. Segundo OLSON et al. (1987), áreas de hiperplasia glandular podem estar associadas a áreas de atrofia do epitélio secretor, nas quais a proliferação de elementos estromais, assim como dilatações císticas, estão presentes. Atualmente, a HPB canina é definida como sendo um aumento dos dois compartimentos, tanto o estromal quanto o glandular (JOHNSTON et al., 2000).

O desenvolvimento, maturação, função e progressão do tecido prostático em relação à hiperplasia prostática benigna ainda não estão totalmente elucidadas, porém, três características desta afecção são bem definidas. Primeiramente, o crescimento prostático é influenciado por hormônios testiculares, sendo que este crescimento não ocorre em animais castrados. Ainda, apesar das manifestações clínicas se iniciarem normalmente em indivíduos mais velhos, o processo patológico que deu origem aos sintomas pode ter se iniciado anos antes. Por último, somente o cão e o homem desenvolvem HPB, sugerindo que exista alta especificidade nestas espécies (WILSON, 1980).

Dentre os fatores hormonais, sabe-se que a testosterona é o principal andrógeno circulante no organismo, e que resulta na formação de outros dois hormônios: a

diidrotestosterona (DHT) e o 17β -estradiol. A DHT é tida como principal hormônio que promove o aumento dos compartimentos estromal e glandular da próstata. A DHT é o principal andrógeno prostático sintetizado na próstata pela ação da enzima 5α redutase do tipo 2, esta por sua vez presente principalmente nas células estromais, atuando de forma autócrina ou parácrina nas células epiteliais glandulares (KLAUSNER et al., 1994; MURAKOSHI et al., 1998; STEERS, 2001). Nos dois tipos celulares, a DHT liga-se a receptores androgênicos nucleares que sinalizam a transcrição de fatores de crescimento para as células epiteliais e estromais (COTRAN et al., 1999). Apesar da testosterona também estimular o crescimento das células prostáticas, a DHT possui maior afinidade pelos receptores prostáticos devido à sua dissociação mais lenta (WINTER & LIEHR, 1996; STEERS, 2001).

Com o objetivo de comprovar o papel dos andrógenos no desenvolvimento da HPB, inúmeros estudos tentaram reproduzir experimentalmente esta alteração. Utilizando o hormônio 3α -androstanoediol (que é convertido no organismo em DHT), WALSH & WILSON (1976) foram capazes de desenvolver a HPB em cães castrados. TRACHTENBERG et al., (1980), COCHRAN et al., (1981), ISAACS & COFFEY (1981), WINTER et al., (1995) e WINTER & LIEHR (1996) também obtiveram resultados semelhantes a esse estudo. Além disso, estes autores observaram que a associação de andrógenos a pequenas doses de 17β -estradiol resultava em maior aumento prostático.

Avaliando a próstata canina em função da idade, POULET (1985) observou que os níveis plasmáticos de DHT se elevam até o primeiro ano de vida do animal e decrescem após essa idade. Já KLAUSNER (1994) constatou que os níveis séricos de estrógeno se mantêm durante toda a vida animal, porém, assim como descrito por POULET (1985), os níveis de testosterona e DHT apresentaram declínio com o passar da idade. Segundo WALSH (1988), estas concentrações hormonais também são relatadas em homens com mais de 60 anos.

De acordo com BERRY et al. (1984) outros fatores podem estar envolvidos no desenvolvimento da HPB, uma vez que o crescimento prostático é significativo e progride mesmo com o declínio dos níveis de andrógenos. Há relatos (DEKLERK et al., 1979; ISAACS & COFFEY, 1981; LAROQUE et al., 1994; WINTER et al., 1995)

descrevendo que, além da ação isolada de andrógenos, o sinergismo com estrógenos também pode desencadear o aparecimento de hiperplasia em cães. O estrógeno pode alterar a resposta a 5 α -DHT, pelo aumento do número de receptores androgênicos no parênquima prostático ou deterioração das células da glândula pela ação de radicais livres. Ainda, os estrógenos modificam o metabolismo esteróide, aumentando a formação de DHT na próstata e estimulando o desenvolvimento da musculatura lisa e síntese de colágeno estromal (EWING et al., 1983; POULET, 1985; BARTSCH et al., 1987; WALSH, 1988).

De acordo com SOUZA (2004) o desequilíbrio entre proliferação e apoptose celular, como consequência dos efeitos dos estrógenos, pode resultar no aparecimento da hiperplasia prostática. A proporção entre o componente epitelial e o estromal se altera com o desequilíbrio androgênico e pode gerar um descontrole na proliferação, migração e morte celular, contribuindo com o desenvolvimento da HPB (JANULIS & LEE, 1999). Em estudo realizado por KLAUSNER et al. (1994) foi observada uma diminuição na síntese de DNA e nas taxas de renovação celular em cães com HPB induzida experimentalmente. Tal fato sugere que se a diferenciação celular for bloqueada há uma diminuição da taxa de morte celular e, conseqüentemente, o desenvolvimento da hiperplasia prostática.

Dentre as inúmeras hipóteses propostas quanto à patogenia da HPB, uma delas sugere que o controle do crescimento prostático seja influenciado por fatores intrínsecos e extrínsecos. Sendo assim, fatores de crescimento, que são potentes mediadores da proliferação, diferenciação e apoptose celular, estariam diretamente relacionados com a parte intrínseca do processo. Por outro lado, a presença de testículos funcionais, fatores ambientais e genéticos, além da produção de andrógenos por outros órgãos como a adrenal, estaria entre os fatores extrínsecos que desencadeariam esta afecção (LEE et al., 1997). Dentre os agentes promotores de crescimento destacam-se o fator de crescimento de ceratinócitos (KGF) e o fator transformador de crescimento β (TGF- β). O KGF é um fator de crescimento encontrado predominantemente nos fibroblastos. Já o TGF- β é encontrado nas células musculares lisas, sendo um potente inibidor do epitélio prostático que, por sua vez, induz a apoptose celular (LEE et al., 1997). Segundo JANULIS & LEE (1999), as células

epiteliais da próstata possuem receptores para estes dois fatores, indicando que na glândula normal este mecanismo está em equilíbrio.

A presença de linfócitos, oriundos de infiltrado inflamatório asséptico, também deve ser considerada como fator somático para o desenvolvimento da hiperplasia prostática benigna, uma vez que estas células podem promover a proliferação de células estromais e epiteliais, além de produzir interleucinas e estimular a formação de matriz colágena (LEE et al., 1997).

Histologicamente existem dois tipos de HPB, a glandular e complexa (cística). A forma glandular pode anteceder a complexa e ocorre em cães com menos de 5 anos de idade (BRENDLER et al., 1983). A próstata aumenta de forma simétrica, as células secretoras proliferam em direção ao lume e geram aumento de volume dos ácinos. À microscopia se observa um aumento no número e no tamanho das células epiteliais, acompanhadas por ínfima, porém, significativa proliferação de fibroblastos estromais e musculatura lisa. Já a forma complexa da hiperplasia ocorre em animais com mais de cinco anos e caracteriza-se por aumento assimétrico, com áreas de hiperplasia glandular, entremeadas com áreas de atrofia. Os elementos estromais são proeminentes, principalmente em áreas atróficas. Frequentemente se observa ácinos dilatados, císticos e preenchidos por material eosinofílico. Os cistos podem apresentar um revestimento epitelial variável, com células de formato colunar e citoplasma eosinofílico ou células cubóides com ausência de capacidade secretora (DEKLERK et al., 1979, BRENDLER et al., 1983; KLAUSNER et al., 1994).

Na literatura, há controvérsias em relação à ocorrência de hiperplasia ou hipertrofia prostática no cão; entretanto, há relatos que sugerem a ocorrência de ambas neste órgão (OLSON et al., 1987). Cães com HPB apresentam marcante aumento no número (hiperplasia) e no tamanho (hipertrofia) das células epiteliais, porém, geralmente, a hiperplasia é predominante (BARSANTI, 1999).

Cães com HPB podem ser assintomáticos. Por outro lado, cães com HPB sintomática apresentam comumente fluido uretral intermitente, de coloração amarelada a hemorrágica, decorrente da presença de cistos que se comunicam com a uretra e pelo aumento da vascularização prostática (JOHNSTON et al., 2001). READ & BRYDEN (1995), observaram em 20 dentre 28 cães a presença de gotejamento de

fluido uretral não associado à urina como o primeiro sinal clínico da doença. Além disso, o aumento prostático pode resultar em hematúria, disúria, tenesmo, fezes secas ou moles com formato laminar, dor abdominal e infertilidade, com maior predominância dos sinais do trato urinário (READ & BRYDEN, 1995).

No homem, o aumento do compartimento estromal ao redor da uretra provoca principalmente disúria com polaquiúria. Raramente tais achados, assim como sinais sistêmicos da doença, são observados em cães (JOHNSTON et al., 2001; MARIA et al., 2003).

O diagnóstico de HPB baseia-se na anamnese, sinais clínicos, exames físico, hematológico, bioquímicos, radiológicos e ultrassonográficos. Em cães, não há menção sobre predisposição racial desta doença. A próstata é caracterizada por simetria dos lobos prostáticos, superfície lisa, macia e deve ser indolor ao toque, portanto qualquer alteração à palpação retal deste órgão deve ser considerada patológica. (READ & BRYDEN, 1995).

O exame radiográfico abdominal se mostra limitado para caracterização de enfermidades prostáticas quando comparado à ultrassonografia, no entanto, permite definir tamanho, forma, localização e densidade radiográfica, assim como evidenciar metástases regionais nos casos de neoplasias prostáticas (FEENEY et al., 1987). Radiograficamente, a posição ventrodorsal permite delimitar o diâmetro da próstata normal, que, raramente, é superior a dois terços do canal pélvico. Embora nesta posição a porção central da próstata geralmente fique obscura devido à sobreposição do sacro e vértebras caudais, as margens laterais frequentemente são visíveis. A próstata normal se localiza caudalmente à bexiga, na cavidade pélvica, com uma medida inferior a 70% da distância entre a sínfise púbica e o promontório sacral. Na HPB, a próstata apresenta aumento superior a 70% da distância sacropubiana, deslocando dorsalmente o cólon e cranialmente à bexiga (OLSON et al., 1987). A uretrocistografia retrógrada é um exame extremamente útil para identificação de prostatomegalia, assim como para a mensuração e avaliação da uretra prostática, uma vez que esta estrutura se apresenta inalterada ou com estreitamento, como ocorre em alguns casos de hiperplasia cística (FEENEY et al., 1987).

A ultrassonografia transabdominal é um método seguro, não invasivo e sensível para a detecção de alterações intraparenquimatosas da próstata. Além disso, permite avaliar tamanho, margens e simetria da glândula, assim como a homogeneidade e ecogenicidade parenquimal (FEENEY et al., 1987; MEDEIROS & LUNARDELLI, 2003)

O diagnóstico definitivo de HPB deve ser realizado por meio de biópsia prostática. A aspiração guiada da próstata por ultrassom pode ser realizada pelas vias transabdominal ou periretal, sendo a primeira a mais indicada (JOHNSTON et al., 2001). Na hiperplasia prostática benigna constatou-se grande número de células semelhantes às normais, ou seja, com citoplasma basofílico e aumento da proporção núcleo/ citoplasma (MUZZI, 1998).

O tratamento é indicado somente em cães que apresentam sintomatologia clínica. Nesta espécie, a orquiectomia bilateral é o tratamento de eleição. A involução prostática e diminuição dos sinais clínicos iniciam-se após 1 semana da realização da orquiectomia. BARSANTI & FINCO (1995) relataram 50% de redução do volume prostático após três semanas da castração e 70 a 75% após 9 semanas. Em outro estudo realizado por READ & BRYDEN (1995), em 8 dentre 9 cães apresentaram remissão completa dos sinais clínicos após 4 semanas da orquiectomia. Por outro lado, não é indicada a ressecção cirúrgica da próstata (prostatectomia) para o tratamento da hiperplasia prostática benigna (SOUZA, 2004).

A terapia conservativa deve ser alternativa ao tratamento cirúrgico nos cães destinados a reprodução ou naqueles em que o estado clínico contra-indica a orquiectomia (SOUZA, 2004).

Dentre estes, pode-se citar a utilização de estrógenos, os quais podem causar diminuição da próstata e redução dos sinais clínicos pela inibição da liberação de gonadotrofina pela hipófise. De acordo com BARSANTI & FINCO (1995) a administração de dietilestilbrestrol (DES) na dose de 0,1mg/kg (VO), por 5 dias e de cipionato de estradiol (ECP) na dose de 0,1mg/kg até um total de 2mg tem demonstrado involução prostática. No entanto, tais medicações são contra-indicadas para o tratamento da HPB, uma vez que, induzem metaplasia escamosa e subsequente estase secretora, predispondo a próstata a infecções secundárias (SOUZA, 2004). A

administração de estrógenos pode resultar em trombocitopenia, leucopenia e anemia aplásica devido à supressão da medula óssea (JOHNSTON et al., 2001).

Os progestágenos, como o acetato de megestrol, acetato de medroxiprogesterona e acetato de clormadinona, atuam na hipófise promovendo uma diminuição na liberação de gonadotrofina e conseqüente decréscimo da concentração sérica de testosterona. Os efeitos colaterais das progestinas sintéticas incluem aumento do apetite, hipotireoidismo e diabetes mellitus (BAMBERG-THALÉN & LINDE-FORSBERG, 1993).

Segundo JOHNSTON et al., (2001) o acetato de megestrol na dose de 0,5 mg/kg/dia por 4 a 8 semanas promove redução prostática. BAMBERG-THALÉN & LINDE-FORSBERG (1993) relataram que após a administração de 3 a 4 mg/kg (SC) de acetato de medroxiprogesterona, em intervalos de 10 semanas, houve a resolução dos sinais clínicos em 84% dos cães, dentre os quais 63% dos animais não apresentaram sinais de hiperplasia prostática após 10 meses da administração de acetato de medroxiprogesterona. Ainda, foi constatada diminuição do tamanho prostático em 53% dos animais após 4 a 6 semanas de tratamento

Em estudo realizado por KAWAKAMI et al., (1993) após a administração de 2 mg/kg/dia de acetato de clormadinona (CMA), duas vezes ao dia por 3 ou 4 meses, houve redução do volume prostático em um período de 4 semanas, e ausência de sinais clínicos após 10 dias do início do tratamento. Em outro estudo, a administração de 2 mg/kg de CMA resultou, respectivamente, em 63 e 79% de redução do volume prostático após 56 e 84 dias de tratamento (ORIMA et al., 1995). Semelhantemente, KAWAKAMI et al., (1995), SHIMIZU et al. (1995), MURAKOSHI et al. (2001) e YASUSHIRO et al., (2001) relataram que após a administração de CMA houve redução do peso e volume prostático, com marcante atrofia do compartimento glandular e estromal, assim como decréscimo nos níveis hormonais de testosterona e DHT. No entanto, altas doses de CMA provocaram decréscimo na motilidade e concentração dos espermatozoides, assim como aumento da percentagem de patologias morfológicas (KAWAKAMI et al., 1993, KAWAKAMI et al., 1995, SHIMIZU et al., 1995).

O acetato de osaterona é um anti-andrógeno desenvolvido inicialmente como droga terapêutica para a HPB canina. TSUTSUI et al., (2001) administrando 0,2 a

0,5mg/kg, via oral, por 7 dias, demonstraram acentuada redução de 62% no volume prostático após 1 semana de tratamento. Esta redução foi superior à promovida pela orquiectomia (60%) após o mesmo período. Entretanto, após 6 meses do término do tratamento, o volume da próstata voltou a valores semelhantes ao início da terapia. Nesse estudo não foi constatada nenhuma alteração na qualidade do sêmen.

O acetato de delmadinona, que atua também como anti-andrógeno, apresenta pouca eficácia, uma vez que somente 2 de 9 cães tratados obtiveram bons ou excelentes resultados (READ & BRYDEN, 1995). COURT et al., (1998) avaliando os efeitos desta droga sobre a função hipofisária, tolerância à glicose e hormônio do crescimento, descreveram que após a administração de 1,5 mg/kg de acetato de delmadinona ocorreu supressão significativa da concentração plasmática do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que a longo prazo poderia causar sinais de insuficiência de glicocorticóides.

A TZP-4238 e WIN-49596 são drogas experimentais que promovem a redução do volume prostático, diminuição da concentração intra-prostática de testosterona e DHT, além do decréscimo na função secretora da próstata (TAKEZAWA et al., 1995; JOHNSTON et al., 2001). Já a flutamida, um antagonista não esteróide dos receptores androgênicos, administrada na dose de 5 mg/kg/dia durante 7 semanas proporciona um redução do tamanho prostático dentro de 10 a 14 dias, sem causar efeitos deletérios sobre a libido e produção espermática (JOHNSTON et al., 2001). Entretanto, este fármaco pode causar o aparecimento de ginecomastia (SOUZA, 2004).

Das inúmeras drogas inibidoras da enzima 5 α -redutase descritas na literatura, destacamos a finasterida. A finasterida é um esteróide sintético que atua na conversão da testosterona em DHT pela inibição da enzima 5 α -redutase tipo 2 (FALLER et al., 1993; CARLIN et al., 1997). Em cães, a administração da droga na dose de 0,1 a 1,0 mg/kg/dia ou uma cápsula de 5 mg para cães entre 5 e 50 kg promove redução do tamanho prostático em 40 a 70% após 8 a 12 semanas de tratamento (LAROQUE et al., 1994; LAROQUE et al., 1995; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 1997; STRZEZEK et al., 2004). Em estudo realizado por SIRINARUMITR et al. (2001) foi observada diminuição do diâmetro e volume da próstata em 24 e 52%, respectivamente, após 16 semanas de tratamento; além do aumento significativo do percentual de células

prostáticas apoptóticas obtidas da terceira fração (prostática) do ejaculado após o uso de finasterida. LAROQUE et al. (1995) observaram, através de avaliações qualitativas, atrofia do epitélio prostático, principalmente na região periuretral. A atrofia da próstata foi caracterizada por marcante redução de tamanho do lúmen glandular e das células epiteliais, diminuição no comprimento e complexidade das projeções papilares dentro do lúmen acinar, e perda da atividade secretória.

A concentração sérica de DHT e o volume do sêmen diminuem após o uso de finasterida (COHEN et al., 1995; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 1997; SIRINARUMITR et al., 2001). IGUER-OUADA & VERSTEGEN (1997) descreveram significativa redução do volume seminal a partir da oitava semana de tratamento, estendendo-se até a vigésima semana. Os mesmos autores constataram que a concentração espermática aumentou significativamente após a administração de finasterida, e que este aumento é inversamente proporcional à diminuição do volume do fluido prostático. Não obstante, os níveis séricos de testosterona e de outros parâmetros seminais permaneceram inalterados (COHEN et al., 1995; IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 1997; SIRINARUMITR et al., 2001).

Estudos recentes têm demonstrado a utilização da toxina botulínica no tratamento da hiperplasia prostática benigna em ratos (DOGGWEILER et al., 1998), cães (CHUANG et al. 2006c; MOSTACHIO, 2008) e em humanos (MARIA et al., 2003; KUO, 2005).

2.3 - Neurotoxina botulínica tipo A

O botulismo é uma intoxicação causada pela neurotoxina botulínica (TB) que resulta em paralisia flácida devido à inibição da liberação de acetilcolina dos terminais pré-sinápticos da junção neuromuscular. Esta é produzida por uma bactéria do gênero *Clostridium* (*Clostridium botulinum*), e apresenta sete sorotipos imunologicamente distintos de TB (A, B, C, D, E, F e G), dos quais somente os tipos A e B apresentam aplicação clínica (SMITH & CHANCELLOR, 2004). Apesar das semelhanças funcionais, estruturais e elevado grau de homologia entre as seqüências de aminoácidos, os sorotipos se distinguem pelo sítio de atuação, potência e duração do efeito. O sorotipo

A é o mais potente e é o que possui efeito mais prolongado quando comparado aos demais. Além disso, pode ser facilmente obtido por meio de cultura, sendo o primeiro a ser isolado na forma cristalina, estável e altamente purificado (HUANG et al., 2000).

A forma ativa da toxina botulínica é proveniente da clivagem de uma cadeia-mãe (cadeia simples) por meio de protease bacteriana semelhante à tripsina. Esse polipeptídeo possui massa molecular de 150 kDa e é composto por duas porções, a cadeia leve(L) e a cadeia pesada (H), que por sua vez, desempenham diferentes papéis no processo de intoxicação celular (BORODIC et al., 1996; AOKI, 2001a; AOKI, 2001b; TURTON et al, 2002). A cadeia leve (L) da toxina botulínica é longa e varia, dependendo do tipo de toxina, entre 422 e 445 segmentos peptídicos, chamados resíduos. Ela apresenta segmentos homólogos concentrados nas porções central e amino terminal. O segmento mais conservado encontra-se na porção central e contém as principais ligações para as zinco peptidases (SPOSITO, 2004). Cada molécula de neurotoxina contém 1 átomo de zinco. A cadeia leve de 50 kDa se une por uma ponte de dissulfeto a uma cadeia pesada (H) de 100 kDa (SHONE & TRANTER, 1995; REITZ et al., 2004; DRESSLER et al., 2005). Ainda, a cadeia pesada apresenta dois domínios funcionais de 50 kDa cada, a porção N-terminal (Hn) e C-terminal (Hc) (TURTON et al., 2002) (Figura 1).

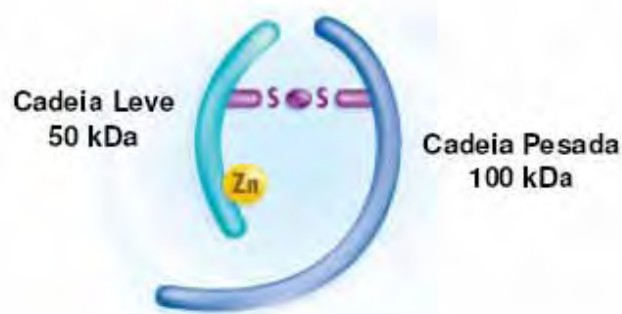


Figura 1. Estrutura da toxina botulínica e suas respectivas subunidades (Adaptado de www.btxa.com. Data de acesso 14/12/2008)

A toxina botulínica inibe a liberação de neurotransmissores por meio da clivagem específica de um receptor conhecido como SNARE (Soluble NSF-attachment protein

receptor) (DAVLETOV et al., 2005). O complexo SNARE tem origem da ligação de uma estrutura protéica formada pela junção da proteína sinaptossomal de peso molecular de 25 kDa (SNAP-25), da proteína de membrana associada a vesícula (VAMP ou sinaptobrevina) e da sintaxina, ao fator sensível à N-etilmaleimida (NSF). Este complexo atua no mecanismo de exocitose, promovendo a aproximação da vesícula sináptica à membrana plasmática do neurônio. Para que ocorra o processo de neurotransmissão, o complexo SNARE é dissociado, pela ação de uma ATPase, em SNAP e NSF (SUDHOF, 1995; DOLLY, 1997).

O mecanismo de toxicidade da toxina botulínica A é composto por três etapas (ligação, internalização e bloqueio neuromuscular) e ocorre pela alta afinidade dessa molécula aos receptores específicos da parede intracelular do terminal pré-sináptico da junção neuromuscular. (SIMPSON, 1980; SIMPSON, 1986; HUMEAU et al., 2000; TURTON et al., 2002) (Figura 2).

Na primeira etapa, a cadeia pesada da toxina liga-se a estruturas glicoprotéicas extracelulares situadas nos terminais nervosos colinérgicos das fibras pré-sinápticas (DAVLETOV et al., 2005; DRESSLER et al., 2005). De acordo com LI & SINGH (1998), a ligação acontece em receptores específicos presentes no sítio da proteína sinaptotagmina, localizada na membrana da terminação nervosa.

A internalização ocorre por meio de endocitose da vesícula lisossomal vinte minutos após a ligação. É mediada por receptores, dependente de energia, parcialmente dependente da estimulação nervosa e independente de íons cálcio (HUGHES & WHALER, 1962; SIMPSON & DASGUPTA, 1983; GÖSCHEL et al. 1997). A conformação estrutural da TB-A sofre modificações e insere-se na membrana bilipídica da membrana da vesícula (formação de poro) e transloca a cadeia leve (porção tóxica da molécula) para o citoplasma neural. O passo seguinte é chamado de redução (clivagem proteolítica) e acontece dentro da célula nervosa sob condições de acidificação, liberando a cadeia L catalítica. As duas hélices da porção Hn da cadeia pesada participam ativamente do processo de translocação da cadeia leve (MONTECUCCO et al., 1996). Quando há quebra da ponte de dissulfeto antes da internalização, a cadeia leve não consegue entrar e, portanto, há perda completa da toxicidade (ZHOU et al., 1995; LI & SINGH, 2000).

A última etapa consiste no bloqueio neuromuscular. A cadeia leve é responsável por bloquear a neuroexocitose, com ação sobre os neurotransmissores, através da atividade de um endopepdase zinco dependente específica para cada um dos três sítios de ligação dentro do sistema neurotóxico sob pH ácido (SPOSITO, 2004). A metalo-endoprotease promove a clivagem da proteína SNAP-25 (proteína essencial para a fusão da vesícula contendo acetilcolina com a membrana do neurônio motor e responsável pelo crescimento do axônio) que resulta no bloqueio intracelular da secreção de acetilcolina e consequente denervação química temporária, geralmente reversível, e redução da atividade neuronal (DOLLY, 1997; REITZ et al., 2004; HARPER et al., 2004; DAVLETOV et al., 2005; DRESSLER et al., 2005). Segundo SPOSITO (2004), a propagação do potencial de ação, a despolarização do nervo terminal dos canais de sódio, potássio, e cálcio não sofrem ação da toxina.

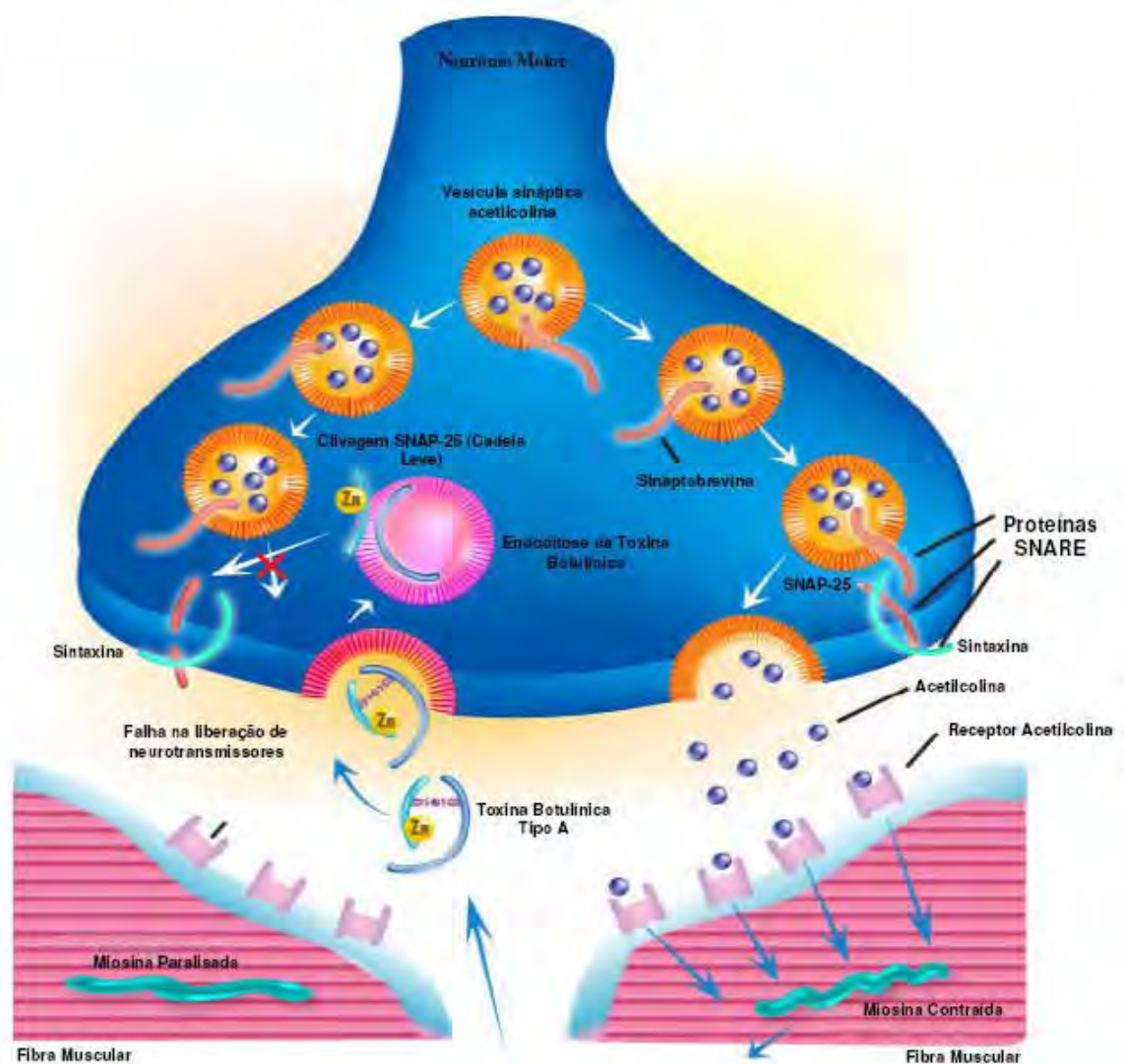


Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação da Toxina Botulínica A (Adaptado de www.btxa.com. Data de acesso 14/12/2008)

A toxina botulínica do tipo A não apresenta ação direta na síntese ou no armazenamento da acetilcolina ou na condução de sinais elétricos ao longo da fibra nervosa. Há evidências de que se a duração da denervação química for de 3 a 5 dias, a transmissão neuromuscular se transforma do estado maduro e estável para a transmissão por sinapses extra juncionais (MEUNIER et al., 2003). Estas são decorrentes do crescimento de brotamentos axonais laterais, provenientes da terminação nervosa original. A partir destes brotamentos há o início de novas transmissões sinápticas que restauram parcialmente o tônus muscular (DE PAIVA et al.,

1999). Segundo DE PAIVA e colaboradores. (1999) estes brotamentos contêm sinaptotagmina II, sinaptofisina, proteínas essenciais para a neurotransmissão, assim como canais de cálcio, sódio e potássio necessários para a condução do potencial de ação. Após 63 dias da aplicação da toxina do tipo A há a recuperação do terminal nervoso original, e com isso os brotamentos axonais começam a involuir e as proteínas de fusão se restabelecem. O término da regressão dos brotamentos se completa em 91 dias, neste período há a recuperação total da capacidade de endo e exocitose da terminação nervosa original (DE PAIVA et al., 1999; DOLLY, 1997) (Figura 3).

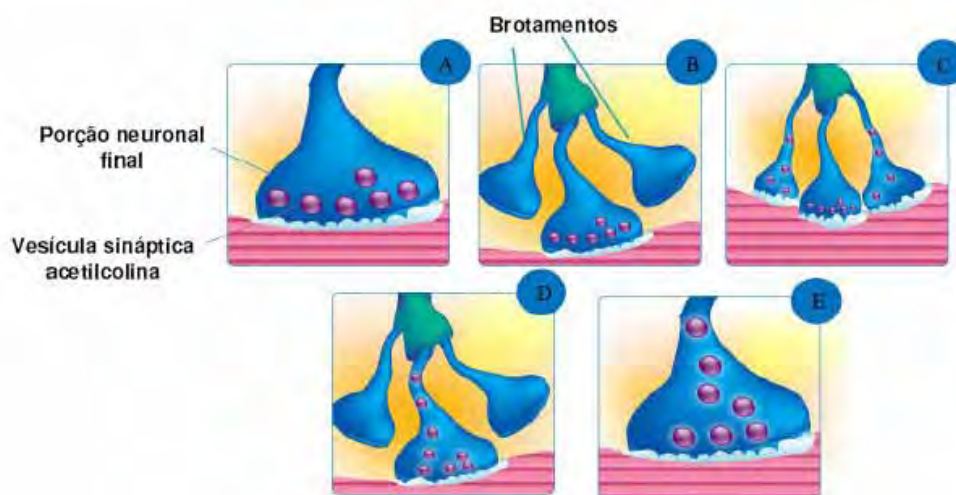


Figura 3. Representação esquemática da denervação química produzida pela toxina botulínica do tipo A. **A.** Repleção das vesículas sinápticas. **B.** Desenvolvimento de brotamentos axonais, oriundos da terminação nervosa original. **C.** Junção neuromuscular parcialmente restaurada. **D.** Involução dos brotamentos e recuperação do terminal nervoso. **E.** Restabelecimento da transmissão nervosa normal (Adaptado de www.btxa.com. Data de acesso 14/12/2008)

DRESSLER et al. (2005) relataram que a toxina botulínica do tipo A interfere no reflexo espinal de estiramento, uma vez que bloqueia a condução do estímulo nervoso das fibras autonômicas para músculos lisos e glândulas exócrinas, assim como das fibras musculares intrafusais.

A administração intramuscular da toxina botulínica promove pequena difusão sistêmica da neurotoxina, porém não atinge o sistema nervoso central. Isto ocorre devido à inativação dessa substância, gerada pela lentidão no transporte axonal retrógrado e pelo seu alto peso molecular (não transpõe a barreira hematoencefálica).

Indiretamente, a toxina reverte às alterações da inibição recíproca, da inibição intracortical e de potenciais somatosensoriais (DRESSLER et al., 2005).

Estudos clínicos utilizando técnicas eletromiográficas de fibra única mostraram aumento da atividade muscular eletrofisiológica em músculos distantes do ponto de injeção, porém com ausência de sintomatologia clínica. AOKI (2001b) demonstrou alterações histológicas nas fibras musculares em regiões bloqueadas e que em média, o raio de ação é de 3 cm da toxina a partir do ponto de injeção. Ainda, foi relatado que a diluição do produto pode influenciar na sua dispersão, e conseqüentemente ampliar o seu raio de difusão (MATARASSO, 1998b). KIM et al. (2003) reportaram que apesar do aumento da diluição da toxina maximizar o efeito paralítico local pode haver o aumento da absorção sistêmica dessa substância, levando a um quadro de enfraquecimento generalizado, particularmente em pacientes susceptíveis.

Os efeitos da injeção de toxina botulínica podem ser visibilizados entre o terceiro e o décimo dia após a aplicação, sendo que o seu pico de ação ocorre entre o quinto e sétimo dia (SANDERS et al., 1986). Estudos eletromiográficos mostram que a amplitude do potencial de ação dos músculos injetados declina após 48 horas da administração e atinge seu ponto mais baixo com 21 dias (MATARASSO, 1998a). Outrossim, os mesmos autores reportam que após 100 dias da aplicação de toxina botulínica a amplitude dos potenciais de ação permanece reduzida em 80 por cento.

Os efeitos benéficos da administração de toxina botulínica podem perdurar por um período de 3 a 6 meses, porém sua duração depende da ação de inúmeros fatores tais como dose total utilizada, gravidade do quadro clínico, presença de outros tipos de terapia associada e fatores individuais como capacidade de regeneração neurológica (SANDERS et al., 1986).

A toxina botulínica apresenta-se em unidades biológicas (U), uma vez que esta é um produto biológico. Não existe equivalência entre as diferentes apresentações farmacológicas da toxina botulínica do tipo A (FULTON, 1998). Há duas apresentações comerciais de toxina botulínica do tipo A disponíveis no mercado, o BOTOX® (Allergan – EUA) com 100 Unidades nominais e o DYSPORT® (Ipsen – Reino Unido) com 500 unidades nominais, a relação de equivalência entre os dois produtos varia de 1:3 a 1:4 em seres humanos (ODERGREN et al., 1998; RANOUX et al., 2002; ROSALES et al.,

2006). Estudos em animais sugerem que a taxa de conversão está entre uma unidade de BOTOX[®] para cada 2,5 e 3 unidades de DYSPORT[®] (ROSALES et al., 2006).

As primeiras aplicações terapêuticas da toxina botulínica no homem foram realizadas para o tratamento do estrabismo e blefaroespasma (SCHURCH et al., 2000; REITZ et al., 2004). No final da década de 80, após inúmeros estudos e descrição dos métodos de purificação da toxina do tipo A, a *Food and Drug Administration* (FDA), aprovou, nos Estados Unidos da América, a utilização da neurotoxina botulínica do tipo A para o tratamento destas afecções e espasmo hemifacial (SCHANTZ & JOHNSON, 1997). Atualmente, a toxina botulínica é utilizada na terapia da distonia cervical, espasticidade focal, hiperhidrose, dissinergia do esfíncter detrusor, paralisia cerebral juvenil, fissura anal, acalasia, analgesia, entre outras (MARIA et al., 2003; REITZ et al., 2004; DRESSLER et al., 2005). Ainda, esta se mostra segura e com alta efetividade no tratamento da hiperplasia prostática benigna humana (MARIA et al., 2003; CHUANG et al., 2005; KUO, 2005; RUSNACK & KAPLAN, 2005; ANTUNES et al., 2007; CHUANG & CHANCELLOR, 2007).

Inúmeros trabalhos indicam a eficácia da toxina botulínica do tipo A no tratamento de disfunções urológicas (MARIA et al., 1998; SHURCH et al., 2000; PHELAN et al., 2001; KUO, 2003; HARPER et al., 2004; KUO, 2004; REITZ et al., 2004; SCHURCH & REITZ, 2004; SMITH & CHANCELLOR, 2004; KARSENTY et al., 2006; THOMAS et al., 2006; KUO, 2007). O uso da neurotoxina botulínica para o tratamento da hiperplasia prostática benigna teve início em virtude da influência da inervação autônoma na função prostática. O componente estático, ou seja, o tecido epitelial prostático (compartimento glandular) está sob controle parassimpático e regulado por andrógenos, enquanto o componente dinâmico, o compartimento estromal, é influenciado por inervação simpática. Tais dados evidenciam que a inervação parassimpática colinérgica da próstata apresenta papel primordial na função secretória acinar da glândula e em seu crescimento, enquanto a inervação simpática noradrenérgica é responsável pela contração da musculatura lisa do órgão (LEPOR & KUHAR, 1984; HIGGINS & GOSLING, 1989; PENNEFATHER et al., 2000; VENTURA et al., 2002).

Não obstante, há relatos de que receptores adrenérgicos e muscarínicos estão presentes nas células epiteliais e no estroma fibromuscular da próstata humana, estimulando os fatores de crescimento epidermal, transformação e proliferação celular (VAALASTI & HERVONEN, 1980; HEDLUND et al., 1985; COCKETT et al., 1993; RUGGIERI et al., 1995; RAVINDRANATH et al., 2001). BLOCH et al., (1997) descreveram que o tecido prostático hiperplásico humano apresenta atividade adrenérgica aumentada quando comparada com o órgão normal. Além disso, a injeção de toxina botulínica do tipo A inibe a liberação de acetilcolina, que por sua vez, bloqueia a proliferação celular e induz a denervação e atrofia do órgão (MARIA et al., 2003; KUO, 2005).

DOGGWEILER et al., (1998) demonstraram que a administração de toxina botulínica A na próstata de ratos promoveu uma redução significativa do peso e tamanho do órgão, além de induzir uma atrofia generalizada com ausência de infiltrados inflamatórios no tecido prostático. A presença de apoptose celular e formação de corpos apoptóticos também foram relatadas.

No homem, MARIA et al., (2003) descreveram que após um mês da aplicação intraprostática de 200U de toxina botulínica A (BOTOX) houve uma redução de 42% na concentração sérica de antígeno prostático específico (PSA), 60% do volume urinário residual e 54% do volume prostático, quando comparados com os valores antes do início do tratamento. Os mesmos autores relataram, ainda, que após 2 meses os volumes prostático e residual de urina, e concentração sérica de PSA sofreram reduções de 68, 83 e 51%, respectivamente. Adicionalmente, foi observada melhora significativa na qualidade de vida, identificada pelo escore de sintomas da *Associação Americana de Urologia*, em pacientes tratados quando comparados com o grupo controle. Não foi constatado nenhum efeito colateral nos pacientes que receberam toxina botulínica.

KUO (2005) utilizando a mesma dosagem de neurotoxina botulínica (200U) em 10 homens com hiperplasia prostática benigna obteve ótimos resultados em 80% dos pacientes e observou uma redução significativa dos volumes prostático total e urinário residual após 3 e 6 meses do início do tratamento. Nestes pacientes, o fluxo urinário máximo aumentou em 30%, passando de 7,6 para 11,6 mL por segundo, já o volume

urinário residual e o volume prostático diminuíram de 243 para 37 mL e de 65 para 49 mL, respectivamente. Com isso, o autor pôde concluir que em pacientes que apresentam coagulopatias ou severas alterações cardíacas, pulmonares e renais (nos quais procedimentos cirúrgicos estão contra-indicados), ou naqueles em que tratamentos conservativos falharam a aplicação de toxina botulínica é extremamente indicada, uma vez que promove uma redução rápida e segura do volume prostático e da resistência uretral.

CHUANG et al., (2005) utilizando 100U de toxina botulínica do tipo A em pacientes com próstatas pequenas e com evidências de HPB, observaram disúria e leve hematúria após a aplicação da toxina em 3 pacientes. No entanto, nenhuma complicação ou efeitos sistêmicos adversos foram relatados. Tais pesquisadores relataram que todos os pacientes apresentaram melhora clínica após 1 semana e que esta atingiu efeito máximo 1 mês após a aplicação. Os mesmos autores relataram que após um mês a média do volume prostático, o escore de sintoma, e o índice de qualidade de vida foram reduzidos em 13,3%, 52,6%, e 44,7%, respectivamente. O fluxo urinário máximo aumentou em 39,8%, passando de 7,3 para 11,8 mL por segundo. Ainda relataram que após 10 meses da aplicação da neurotoxina os pacientes apresentavam resultados satisfatórios.

LARSON et al. (2005) em estudo multicêntrico com 40 pacientes recebendo 100 ou 200U de toxina botulínica, evidenciaram diminuição do escore internacional de sintomas prostáticos (IPSS) e aumento do fluxo urinário. GUERCINI et al. (2005), apresentaram dados semelhantes aos autores anteriormente citados, demonstrando redução do volume residual urinário e prostático, e aumento do fluxo de urina.

Recentemente, CHUANG et al. (2006a) relataram que 31 de 41 homens (76%), que receberam 100 ou 200U de toxina botulínica do tipo A apresentaram melhora na qualidade de vida. Por outro lado, em 29% dos pacientes não foi observado redução do volume prostático, porém em 58% destes pacientes, houve aumento no fluxo urinário. CHUANG et al., (2006b) avaliando a função da toxina botulínica na próstata de ratos evidenciaram uma atrofia prostática generalizada, com aumento na taxa de apoptose celular e redução na proliferação das células. Os mesmos autores observaram uma redução no volume da próstata dose-dependente, sendo que a administração de 5U

promoveu uma redução de 24,7%, enquanto a aplicação de 20U acarretou um decréscimo de 54,8%. PARK et al., (2006) obtiveram resultados semelhantes aos apresentados por MARIA et al. (2003), KUO (2005) e CHUANG et al. (2006a e 2006c).

O primeiro estudo referente ao uso da toxina botulínica do tipo A no parênquima prostático canino foi conduzido por CHUANG et al. (2006c). Neste estudo, oito cães adultos receberam 100U de toxina botulínica A ou solução salina. Apesar dos resultados se mostrarem estatisticamente desfavoráveis em relação ao decréscimo no volume prostático, ao exame macroscópico foi observado redução prostática significativa, assim como uma consistência mais macia da glândula quando comparada ao grupo controle. Avaliações histológicas realizadas com coloração de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling*) revelaram apoptose celular após 1 e 3 meses da aplicação da toxina. Nenhuma complicação incluindo infecção, incontinência, retenção urinária ou perda de peso foram observadas.

LIN et al. (2007), estudando os efeitos da toxina do tipo A sobre a função contrátil da próstata de cães, observaram que após 1 mês da aplicação de 200U de toxina botulínica houve uma diminuição média de 24% no tamanho do órgão e significativa redução da pressão uretral prostática. Tais reduções não foram relatadas nos animais do grupo controle ou nos cães que receberam 100U intraprostáticamente. Já a função contrátil da próstata, constatou-se que após a administração da toxina botulínica do tipo A ocorreu menor resposta desta quanto à estimulação. A administração de 100 ou 200U de neurotoxina induziu atrofia da glândula prostática, sendo esta atrofia mais pronunciada no grupo de 200U.

MOSTACHIO (2008), em estudo realizado em cães com HPB, relatou a remissão dos sinais clínicos em média duas semanas após a injeção intraprostática de toxina botulínica A nas concentrações de 250U e 500U (DYSPO[®]) assim como decréscimo das lesões cavitárias (cistos) em parênquima prostático e maior homogeneidade do mesmo ao exame ultrassonográfico. Ainda, no grupo de cães que receberam a aplicação de 500U de TB-A, foi constatada redução significativa do volume prostático e altura dorsoventral quatro semanas após a aplicação, assim como nos valores relacionados ao comprimento prostático na oitava semana de tratamento.

2.4 - Métodos de avaliação da fertilidade

Uma das maneiras mais utilizadas para avaliação da fertilidade do sêmen canino cães é a avaliação *in vitro*. Os ensaios *in vitro* são capazes de mostrar quais os aspectos da função espermática estão alterados. Inúmeras técnicas têm sido descritas para avaliar o sêmen, porém a combinação de diferentes ensaios mostrou resultados mais reais quando comparados um único teste, na tentativa de prever a fertilidade *in vivo* (AMANN et al., 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 por programas de computador. (VERSTEGEN et al., 2002). A motilidade progressiva informa sobre uma das características necessárias ao espermatozóide para a fertilização. Entretanto, a correlação entre a motilidade e a capacidade da célula espermática para fertilizar o ovócito ainda não está completamente esclarecida e os achados são conflitantes (TARDIF et al., 1999).

A morfologia espermática tem sido correlacionada à fertilidade no cão. Estudos realizados com inseminação artificial utilizando sêmen fresco demonstraram uma fertilidade 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 normais. (OETTLÉ et al., 1993).

OEHNINGER et al. (1988) em estudo realizado em homens teratozoospermicos concluiu que a concentração espermática está intimamente associada à fertilidade, uma vez que aumentando a concentração de espermatozóides da amostra, houve um aumento significativo na taxa de fertilização *in vitro*.

A integridade de membrana da célula espermática é um método complementar para avaliação morfofuncional e viabilidade espermática (JEYEDRAN et al., 1984; MAGISTRINI et al., 1997). Sendo assim, o teste hiposmótico e a coloração com sondas fluorescentes são capazes de fornecer resultados eficientes sobre a integridade de membrana dos espermatozóides. (JEYEDRAN et al., 1984; INAMASSU et al., 1999)

O primeiro baseia-se no comportamento da célula espermática frente a um meio hiposmótico, ou seja, na tentativa de equilibrar o meio intra e extracelular, ocorre influxo de água através da membrana, provocando edema. Com o edema a cauda se enrola e esta alteração é facilmente observada por meio do microscópio de contraste de fase (JEYEDRAN et al., 1984; INAMASSU et al., 1999).

A análise por meio de microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo de colorações utilizando sondas fluorescentes foram desenvolvidas para avaliar a integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial, capacitação espermática e integridade do acrossomo (MAGISTRINI et al., 1997). Ainda, estas avaliam a presença de rupturas como resultado da morte espermática, em que a membrana pode estar fisicamente intacta, porém quimicamente inativa (KUMI-DAKA & BADTRAM, 1994). Há inúmeras colorações que podem ser utilizadas para se determinar a integridade da membrana plasmática, dentre elas a associação do iodeto de propídeo ao diacetato 6-carboxifluoresceína ou ao SYBR-14 (HARRISON & VICKERS, 1990; MAGISTRINI et al., 1997). Outros tipos de sondas fluorescentes também são utilizados para avaliação da viabilidade espermática, dentre elas o *ethidium bromide* e o Hoescht 33258 associado ao diacetato de 6- carboxifluoresceína (MAGISTRINI et al., 1997).

GARNER et al. (1986) descreveram o uso do diacetato de 6- caboxifluoresceína e o iodeto de propídeo para se determinar, por meio de citometria de fluxo, a integridade da membrana do espermatozóide de bovinos e outras espécies.

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 et al., 1988).

Durante anos, o plasma seminal foi considerado apenas como um meio de sustentação as células espermáticas (SOUZA et al., 2007). Porém, atualmente estudos adicionando plasma seminal de machos de alta às células espermáticas de baixa fertilidade provaram a importância deste fluido a fertilidade *in vivo* AURICH et al.(1996) e RODRIGUES et al. (1999).

A determinação dos componentes do plasma seminal pode ser considerada como uma forma de avaliação do ejaculado, visto que alguns destes componentes já foram correlacionados à fertilidade (AURICH et al., 1996). Além disso, a função espermática é

altamente dependente do meio iônico em que os espermatozóides estão inseridos (HAMAMAH & GATTI et al., 1998). A infertilidade em homens tem sido correlacionada a concentrações anormais de alguns íons no plasma seminal (PANDY et al., 1983; STANWELL et al., 1983; CHIA et al., 2000)

SOUZA et al. (2006) avaliando o efeito da vasectomia sobre o perfil bioquímico do plasma seminal e a sua correlação com os parâmetros espermáticos constataram correlações negativas entre a concentração de potássio (pré-vasectomia) e a motilidade espermática, vigor espermático, teste hiposmótico e porcentagem de espermatozóides com a membrana íntegra (coloração por sondas fluorescentes). Ainda, observaram a ocorrência de correlação positiva entre o sódio e o potássio pré-vasectomia e pós-vasectomia, além de um aumento significativo (14%) nos valores de cálcio após a realização da vasectomia.

BARTLETT et al. (1962) determinaram a concentração de sódio do ejaculado canino de 113,5 mmol/L (113,5 mEq/L) e de cloreto de 152 mmol/L (152 mEq/L). Já JAMES et al. (1979), em estudo avaliando alguns eletrólitos do plasma canino, determinou as concentrações de sódio e potássio de 141,0 mEq/L e 12,1 mEq/L, respectivamente. ENGLAND et al. (1990) descreveram para a espécie canina níveis de sódio, potássio e cálcio, respectivamente 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). SOUZA et al. (2003) encontraram valores médios de 145,32 mEq/L de sódio e 11,06 mEq/L de potássio.

O plasma seminal apresenta inúmeros 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. Tais fatores são bem evidentes em sistemas *in vitro*. Na fertilização *in vivo*, mecanismos previnem o transporte do plasma seminal até o sítio de fertilização e elementos do microambiente deste local são capazes de auxiliar na remoção desses fatores (KANWAR, 1979; MANJUNATH et al., 1993a).

Os espermatozóides perdem a capacidade de sintetizar e secretar proteínas durante a espermatogênese. Porém novas proteínas são aderidas pela interação da célula espermática com o meio, incluindo as proteínas presentes no fluido epididimal, no

ducto deferente e no plasma seminal, durante a ejaculação. Essas proteínas têm sido correlacionadas à fertilidade e alguns autores acreditam que as mesmas estavam correlacionadas a congelabilidade do sêmen (NAABY- HANSEN et al., 1997; TULSIANI et al., 1997; RONCOLETTA et al., 1999)

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 à presença de proteínas do plasma seminal ligadas à superfície espermática, o que leva a modulação da reação acrossomal induzida pela glicoproteínas da zona pelúcida (MILLER et al., 1990). As principais proteínas ligadas a heparina em bovinos são denominadas de BSPs (proteínas do plasma seminal bovino), estas são produtos da vesícula seminal que ligam-se ao espermatozóide durante a ejaculação e as GAGs no trato reprodutor feminino (MANJUNATH et al., 1993a). Estas proteínas têm sido identificadas em outras espécies como eqüinos (REINERT et al., 1997), suínos (CALVETTE et al., 1996) e cães (SOUZA et al., 2006).

A concentração protéica do plasma seminal varia de 3 a 7%, dependendo da espécie (WITE et al., 1980). ISAACS et al. (1980) determinaram valores médios de proteína para o cão de 1,09 g/dL, já SOUZA et al. (2006) encontraram valores médios de 2,09 g/dL para a mesma espécie. De acordo com ENGLAND et al. (1990), a concentração de proteína total é maior na segunda fração do ejaculado. Segundo os mesmo autores, os valores médios são de 14,4 g/L (1,44g/dL), 42,5 g/L (4,25 g/dL) e 30,7 g/L (3,07 g/dL) respectivamente para a primeira, segunda e terceira fração.

Em bovinos, KILLIAN et al (1993) avaliando o perfil protéico do plasma seminal de touros por meio de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida sugeriu a existência de 4 proteínas intimamente relacionadas à fertilidade. Dentre elas, duas proteínas, 26 kDa (pI 6,2) e 55 kDa (pI 4,5), foram associadas a touros de alta fertilidade, em contrapartida as demais, 16 kDa (pI 4,1) e 16 kDa (pI 6,7) foram encontradas em touros de baixa fertilidade. CANCEL et al. (1997) identificaram a proteína de 55 kDa (pI 4,5) do plasma seminal bovino como sendo uma osteopontina. Já GERENA et al (1998) constataram que a proteína de 26 kDa (pI 4,1) é uma "lipocalin-type prostaglandin- D synthase".

Em estudo semelhante realizado em garanhões, houve correlação positiva da proteína SP1 (72 kDa e pl 5,6) do plasma seminal à fertilidade, entretanto observou-se correlação negativa das proteínas SP2 (75 kDa e pl 6,0), SP3 (18 kDa e pl 4,3) e SP4 (16 kDa e pl 6,5). Por meio da técnica de *western blot* foram encontradas similaridades entre a proteína SP1 à proteína de 55 kDa (pl 4,5) bovina (BRANDON et al., 1999).

Em estudo sobre a composição protéica da secreção prostática canina, STUBBS e RESNICK (1978) identificaram seis bandas protéicas de pesos moleculares de 86 kDa, 73k Da, 28 kDa, 25 kDa, 19 kDa e 16 kDa.. Outrossim, a banda de 86 kDa foi encontrada somente em cães não castrados.

SOUZA & LOPES (2002), utilizando gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) sob condições desnaturantes encontraram 25 bandas, com pesos moleculares variando de 136 kDa a 3,5 kDa, em cães de fertilidade desconhecida (n = 5). MARTINS et al.(2002), em estudos sobre o perfil protéico do fluido epididimal canino, encontraram um padrão semelhante ao verificado no plasma seminal.

SOUZA et al. (2007) identificaram a presença de 37 bandas protéicas no plasma seminal canino (n=20). No presente estudo, os pesos moleculares variaram de 100 kDa a 3,6 kDa, sendo 13 bandas (49,7 kDa, 33,2 kDa, 26,4 kDa, 19,5 kDa, 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) presentes em todos os cães. Ainda, foi constatado que 85% das bandas apresentavam pesos moleculares abaixo de 17 kDa e dentre elas, foi identificada altas concentrações da banda de 15,6 kDa em todos os animais. Além disso, foi observada correlação positiva entre a IOD (densidade óptica integrada) de duas bandas (67 kDa e 58,6 kDa) e parâmetros espermáticos (motilidade e vigor espermáticos, porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais, teste hiposmótico, coloração por sonda fluorescentes – 6, diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio). Por fim, os autores sugeriram que a banda de 15,6 kDa, seria uma subunidade da arginina esterase.

A arginina esterase também é conhecida como proteína específica prostática canina (CPSE) e é uma proteína com ação enzimática, encontrada em altas concentrações no fluido prostático do cão (aproximadamente 10 ng/mL) (MCENTEE et al., 1987). É produzida pelo epitélio prostático e sua secreção depende da ação de

andrógenos (FRENETTE et al., 1987). A atividade proteolítica *in vivo* dessa proteína ainda é desconhecida. Há hipóteses de que a CPSE se liga ao espermatozóide e com isso, esta proteína pode catalisar proteínas presentes na superfície espermática ou ser transportada como proteína “ligada” e atuar em sítios distantes (DUBÉ, 1994). De acordo com alguns autores, o peso molecular médio da CPSE presente no plasma seminal é de aproximadamente de 29,5 kDa por filtração em gel (Sephadex G-100) e de 25 kDa utilizando a de eletroforese SDS-PAGE na ausência de mercaptoetanol (CHAPDELAINÉ et al., 1984). A proteína é formada por duas subunidades, H e L, com pesos moleculares de 15 kDa e 12 a 14 kDa, respectivamente (ISAACS & SHAPER, 1985). SOUZA *et al.* (2007), supuseram que a banda de 15,6 kDa pode ser uma subunidade da CPSE, uma vez que esta foi mais abundante no plasma seminal de cães estudados, por SDS-PAGE sob condições desnaturantes e seu peso molecular assemelhou-se ao de uma das subunidades da arginina esterase descritas na literatura.

A arginina esterase é considerada um marcador imunológico da próstata normal de cães (MCENTEE et al., 1987) e apresenta grande semelhança com o PSA humano (DUBÉ et al., 1986). De acordo com CALVETE et al. (1995) a CPSE possui certa homologia às proteínas ligadoras de heparina (HBPs) de equinos. As HBPs têm sido associadas à fertilidade em algumas espécies (SOUZA et al., 2006). Acredita-se que estas proteínas participam ativamente do processo de fertilização, ligando-se aos glicosaminoglicanos (GAGs) e a heparina e a outras proteínas trato reprodutor, sendo correlacionadas ao processo de capacitação e reação acrossomal (MILLER et al., 1990).

Em bovinos as proteínas ligadoras de heparina são denominadas BSPs (proteínas do plasma seminal bovino) (CHANDONNET et al., 1990) e acredita-se que estas também participam do processo de capacitação e reação do acrossomo. As BSPs são provenientes da vesícula seminal e ligam-se ao espermatozóide durante a ejaculação e aos GAGs no trato reprodutor feminino (MANJUNATH et al., 1993). Em touros uma proteína denominada de “fertility associated antigen” (FAA) é encontrada na membrana espermática de em touros com alta taxa de fertilidade (BELLIN et al., 1996). RONCOLETTA et al. (1999) encontrou uma proteína de 61,8 kDa presente em altas

concentrações em touros altas taxas de congelabilidade e ausente em touros de baixa congelabilidade. Outrossim, uma ribonuclease de 14 kDa foi encontrada em altas concentrações no plasma seminal de com baixa qualidade de sêmen após a descongelação (RONCOLETTA et al., 2002). O mesmo autor constatou a presença de 28 spots correlacionados a fertilidade de touros, sendo um ligado a baixa fertilidade e 27 a alta fertilidade (RONCOLETTA et al., 2006).

Em cães, não há estudos sobre a ação das proteínas ligadoras de heparina a fertilidade. O plasma seminal canino contém de 19 a 23 proteínas que se ligam a heparina, (SOUZA et al., 2006; SOUZA et al., 2007). Por meio da técnica de *western blotting* SOUZA et al (2007) observou a interação de uma destas bandas com o anticorpo anti-osteopontina.

Hipótese

O uso da toxina botulínica tipo A como fármaco para o tratamento da HPB interfere na fertilidade *in vitro* de cães?

Objetivo geral

Foi o de avaliar a fertilidade *in vitro* de cães com hiperplasia prostática benigna, no pré e pós tratamento à terapia com toxina botulínica do tipo A.

Objetivos específicos

- Analisar o espermiograma
- Verificar as concentrações de proteína e cloretos totais, cálcio, sódio, potássio e pH do plasma seminal.
- Caracterizar o perfil eletroforético do plasma seminal.
- Identificar a densidade óptica da banda de peso molecular de 15 kDa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais e grupos experimentais

Foram utilizados dezoito cães machos, sem raça definida, com idades entre 5 e 8 anos, pesando entre 15 e 25Kg, provenientes do canil do Setor de Reprodução e Obstetrícia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp *campus* Jaboticabal. Antes do início do experimento e ao término deste os cães foram clinicamente avaliados e submetidos a exames hematológico, urinário, seminal e sorológicos para leptospirose e brucelose canina, assim como exames radiográfico e ultrassonográfico da próstata. Compuseram os grupos experimentais os animais sadios e portadores de hiperplasia prostática benigna. Todos foram condicionados para colheita de sêmen durante um período de 4 a 6 semanas antes do início do experimento e alojados no canil do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp *campus* Jaboticabal. Os cães receberam com ração comercial (Special Dog[®]), duas vezes ao dia e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais de 6 cães cada. Foi preconizado a injeção intraprostática de um volume fixo de 4,0 mL. No grupo controle (GC), os animais foram submetidos à injeção intraprostática de solução fisiológica de NaCl 0,9% estéril, dividida em duas aplicações de igual volume, administradas em cada lobo prostático. Já no grupo I (GI), cada cão recebeu a injeção de uma solução de toxina botulínica do tipo A¹ na concentração de 250 unidades biológicas (U), dividida em duas aplicações de igual volume, administradas em cada

¹ Dysport[®] - Aché Laboratórios Farmacêuticos S/A – São Paulo- Brasil

lobo prostático. Por fim, no grupo II (GII), o mesmo procedimento descrito para o GI foi realizado, porém foi utilizada uma solução contendo 500 U de neurotoxina botulínica A

3.2 – Toxina botulínica do tipo A

3.2.1 – Diluição

A toxina botulínica A era mantida sob refrigeração entre 5 e 8°C, seguindo-se a orientação do fabricante. Cada frasco continha 500U de TB-A liofilizada que era diluída somente no momento da aplicação. Para se obter solução com concentração de 250U de TB-A, o conteúdo do frasco foi diluído em 8 mL de solução fisiológica de NaCl; 0,9% estéril. Já uma solução contendo 500U de TB-A foi obtida por meio da diluição do conteúdo do frasco em 4 mL de solução salina de NaCl 0,9% estéril. O uso de máscara, luvas e óculos protetor foi essencial durante o manuseio da toxina. Preconizou-se a injeção lenta da solução fisiológica no interior do frasco, para evitar a formação de bolhas. Após a diluição, a suspensão foi homogeneizada por meio de movimentos lentos e circulares até completa solubilização. Este cuidado é de extrema importância para preservação da estrutura molecular da neurotoxina.

3.2.2 – Injeção da toxina botulínica do tipo A e solução fisiológica de NaCl 0,9%

Todos os animais foram submetidos ao jejum hídrico e alimentar de 4 e 12 horas, respectivamente, antes do procedimento. Em todos os grupos, os cães foram pré-medicados com levomepromazina² (1 mg/Kg, IM) e cloridrato de petidina³ (3 mg/Kg, IM) e ampicilina sódica⁴ (22 mg/Kg. IV). Após 15 minutos, os animais foram induzidos com

² Neozine® – Sanofi Aventis – São Paulo-SP

³ Dolossal®. - Cristália Produtos Químicos e Farmaceuticos Ltda. –Itapira-SP

⁴ Ampicilina Veterinária – Univet – São Paulo-SP

propofol⁵ na dose de 5 mg/Kg por via intravenosa e, em seguida, foram entubados utilizando-se sonda de Magil de diâmetro adequado ao porte do animal. Posteriormente, os animais foram mantidos com anestesia geral inalatória (Isoflurano⁶) em 100% de oxigênio e fluxo de 30 mL/Kg/min em circuito com reinalação parcial de gases sob ventilação espontânea.

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e submetidos à tricotomia em região pré-escrotal. Ato contínuo foi feita antisepsia local com álcool 70% e clorexidine 2%. Por meio de ultrassonografia transabdominal identificou-se a glândula prostática (Figura 4).

⁵ Diprivan® 1% - Atrazeneca do Brasil Ltda – São Paulo-SP

⁶ Forane - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. - São Paulo, SP

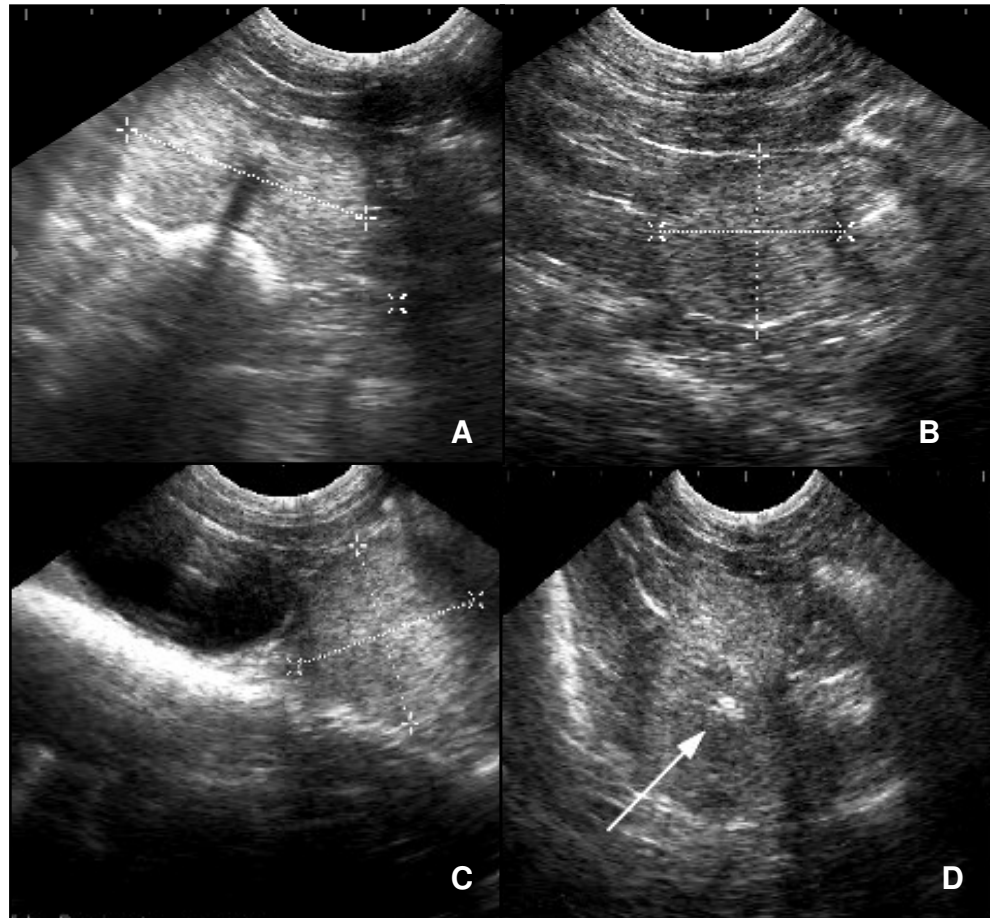


Figura 4. Imagens ultrassonográficas dos cortes transversal (A e D) e corte longitudinal (B e C) da glândula prostática. Na figura D observa-se a presença da extremidade da agulha (seta) no momento da deposição da solução de TB-A no parênquima prostático.

Uma agulha de calibre 0,7x30 foi introduzida perpendicular a pele, na região pré-escrotal e com o auxílio do ultrassom foi guiada e introduzida no interior do parênquima prostático. Para facilitar a administração da toxina botulínica, procedeu-se a fixação digital da glândula através de palpação retal.

3.3 - Colheita de sêmen

Foi realizada antes e depois de 2, 4 e 8 semanas da administração da solução salina de NaCl 0,9% (GC) e da toxina botulínica A (GI e GII), por meio de estimulação digital (método da mão enluvada), como descrito por JONHSTON (1991) (Figura 5).



Figura 5. Material utilizado para colheita e análise de sêmen (A) e método da mão enluvada (B).

Os ejaculados (segunda e terceira frações, espermática e prostática, respectivamente) foram colhidos em tubos graduados de 15 mL acoplados a funis, ambos de plástico, previamente aquecidos a 37°C em banho-maria.

3.4 - Análises físicas e morfológicas do sêmen

3.4.1 – Avaliações macroscópicas

Imediatamente após colheita, os ejaculados foram avaliados quanto ao volume e cor.

O volume foi determinado por meio de leitura do tubo de colheita graduado. A cor foi determinada por meio de análise subjetiva e a cor aceita como normal foi a branca opalescente. Amostras com alteração de cor foram descartadas.

3.4.2 – Análises microscópicas

Avaliou-se motilidade, vigor, concentração, morfologia espermática. A integridade de membrana foi analisada por meio do teste hiposmótico e coloração com sondas fluorescentes (DIC e IP).

3.4.2.1 – Motilidade, vigor e concentração espermática.

Para se avaliar a motilidade (porcentagem de espermatozoides que apresentavam motilidade progressiva) e vigor espermáticos, uma gota do ejaculado foi colocada entre lâmina e lamínula previamente aquecidas como descrito por KRAUSE (1966). Sob microscopia ótica de luz em aumento de 40X, a MP e o vigor espermático foram subjetivamente avaliados em uma escala de 0 a 100% e de 0 a 5, respectivamente.

Mediante diluição de 50 µL de sêmen em 950 µL de formol salina tamponada (CBRA, 1998) aquecida a 37°C (concentração espermática de 1:20), procedeu-se a contagem das células espermáticas, com auxílio da câmara hematimétrica de *Neubauer*.

3.4.2.2 – Morfologia espermática

Para cada amostra colhida foram realizados esfregaços em lâmina a partir de alíquotas 5µl de sêmen *in natura*. Foram confeccionadas duas lâminas por amostra e após a elaboração dos esfregaços estes foram fixados em formol salina tamponada aquecida a 37°C, durante 15 minutos. As lâminas foram secas em temperatura ambiente e posteriormente coradas pelo método de KARRAS (KA) modificado por PAPA et al. (1986) (Apêndice A).

Após a secagem, foram avaliadas 200 células espermáticas de cada esfregaço por meio de microscopia ótica de luz, com objetiva de imersão (100X). As alterações morfológicas foram expressas em porcentagem e classificadas em defeitos maiores e menores (BLOM, 1972).

3.4.2.3 – Avaliação da integridade de membrana

3.4.2.3.1 - Teste Hiposmótico

Foram realizados dois testes para se avaliar a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, o teste hiposmótico e a coloração com sondas fluorescentes.

A avaliação da membrana plasmática por meio do teste hiposmótico foi realizada logo após a colheita da amostra, utilizando 1,0 mL de solução de frutose na concentração de 100mOsm/Kg (Tabela 1B - Apêndice B), previamente aquecida a 37°C, acrescida de 20 µL de sêmen.

A solução foi incubada por 30 minutos na mesma temperatura. Após esse período, uma alíquota de 10 µL foi colocada entre lâmina e lamínula e procedeu-se a contagem de 100 espermatozoides, em microscopia de contraste de fase, com aumento de 40X. As células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda enrolada. O resultado foi determinado em porcentagem, sendo o cálculo realizado de acordo com a fórmula descrita por REVELL & MRODE (1994):

3.4.2.3.2 – Coloração por sondas fluorescentes

A integridade de membrana também foi avaliada por meio de dois corantes fluorescentes, o diacetato de 6-carboxifluoresceína (DIC) e o iodeto de propídeo (IP), de acordo com HARRISON & VICKERS (1987) adaptado por CUNHA et al (1996) para a espécie canina, para a identificação de células íntegras e lesadas (Tabela 1C – Apêndice C).

Após a preparação da lâmina (preparação úmida), as amostras foram avaliadas ao abrigo da luz, em microscópio de fluorescência, em aumento de 100X (imersão), com filtros de 480 a 610 nm (fluoresceína e rodamina, respectivamente). Foram contadas 200 células por amostra de partida e células com coloração verde fluorescente foram consideradas de membrana íntegra e as vermelhas ou vermelhas e verdes foram consideradas lesadas.

3.5 - Análise bioquímica do plasma seminal

O plasma seminal foi separado dos espermatozóides por centrifugação a 800 x g, durante 20 minutos. O sobrenadante foi retirado e re-centrifugado a 10000 x g, durante 30 minutos, a 4°C, para garantir a ausência de espermatozóides no sobrenadante. Nas análises bioquímicas foram mensurados teores de proteína e cloretos totais, cálcio, potássio, sódio e pH. Com exceção do pH, a determinação da concentração dos constituintes bioquímicos foi realizada no laboratório clínico do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp *campus* Jaboticabal, por meio de kits LABTEST^{®7}. As técnicas utilizadas para a dosagem de cada elemento bioquímico analisado estão descritas abaixo.

3.5.7- Proteínas totais

A determinação das concentrações de proteínas totais do plasma seminal foi realizada por meio do método colorimétrico do Biureto (Tabela 1D - Apêndice D).

3.5.8- Cloretos Totais

As concentrações de cloretos totais do plasma seminal foram mensuradas pelo método do Tiocianato (Tabela 2D – Apêndice D).

3.5.9- Cálcio

As concentrações de cálcio do plasma seminal foram determinadas pelo método da cresolftaleína complexona. As leituras foram realizadas por meio de analisador de íons seletivo⁹ e expressas em mg/dL.

⁷ LABTEST Diagnóstica S/A- Lagoa Santo-MG

3.5.10 - Potássio

As leituras das concentrações de potássio presentes no plasma seminal foram obtidas por meio de analisador de íons seletivo⁸ e expressas em mmol/dL.

3.5.11 - Sódio

As leituras das concentrações de potássio presentes no plasma seminal foram obtidas por meio de analisador íon seletivo e expressas em mmol/dL.

3.5.12 - pH

O pH do plasma seminal foi determinado por meio de Phmetro digital⁹.

3.5.7- Análises das proteínas do plasma seminal

A eletroforese SDS- Page foi realizada conforme descrito por LAEMMLI (1970) e adaptado por SOUZA (2003), utilizando duas concentrações de poliacrilamida (29,2% de Acrilamida¹⁰ e 0,2% de Bisacrlamida¹¹) de 12 e 18%, nos géis de corrida para cada amostra.

As corridas eletroforéticas foram realizadas em mini cubas verticais¹². Após a limpeza das placas de vidro com álcool etílico, estas foram colocadas sobre o suporte da cuba para serem montadas. Os géis de separação de 12 e 18% foram montados conforme a Tabela 1 e colocados entre as placas de vidro com o auxílio de uma pipeta de plástico de 10 mL. Uma pequena quantidade água MilliQ foi depositada sobre o gel para evitar o contato com o ar, permitindo uma superfície mais homogênea. A polimerização do gel ocorria em um intervalo de 15 a 30 minutos.

⁸ ISELAB Electrolyte Analyser, DRAKE – São José do Rio Preto.

⁹ DM 21 analisador de íons e phmetro, DIGIMED – São Paulo, SP, Brasil.

¹⁰ PlusOne Acrylamide PAGE, Amershan Biosciences – Uppsala, Suécia

¹¹ PlusOne Methyllenebisacrylamide, Amershan Biosciences – Uppsala, Suécia

¹² Hoefer MiniVE Vertical Eletrophoresis System, Amershan Biosciences – Uppsala, Suécia

Tabela 1 – Componentes dos géis de separação de poliacrilamida na concentração de 12 e 18% para a eletroforese SDS-PAGE.

Concentração de poliacrilamida	12%	18%
Solução A (30% de acrilamida e 0,8% de bisacrilamida)	6 mL	9 mL
Solução B (TRIS HCl 1,5 M, pH 8,8, 0,4% SDS em água MilliQ)	3,75 mL	3,75 mL
Água MilliQ	5,25 mL	2,25 mL
Persulfato de Amônia 10%	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL
Volume Total	15 mL	15 mL

Durante este intervalo, as amostras foram diluídas com água milliQ numa concentração final de 2 µg/µL (para o gel de 18%) e 5 µg/µL (para o gel de 12%) de proteína total por amostra. Ato contínuo, 10 µL de cada amostra foram misturadas com 40 µL de tampão da amostra (**0,6 mL TRIS-HCl 1 M pH 6,8; 5,0 mL Glicerol 50%; 2,0 mL SDS 10%; 0,5 mL 2-Mercaptoetanol; 1,0 mL Bromofenol azul 1%; 0,9 mL Água MilliQ**) e homogenizadas com agitador de tubos¹³. Em seguida, as amostras foram fervidas a 95°C, durante 7 minutos.

Um molde de polietileno em formato de "pente" foi colocado sobre o gel de separação polimerizado, após a retirada da água por meio de papel filtro. O gel de empilhamento a 5% foi preparado conforme o descrito na Tabela 2 e depositado no local em que se encontrava o pente, 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. As canaletas foram "lavadas" com tampão corrida (**TRIS 25mM, glicina 192 mM, SDS**

¹³ Multimixer, Biomixer, modelo MVS-1, Brasil

0,1% em água milliQ) diluído na proporção de 1 de tampão para 4 de água MilliQ com auxílio de uma seringa.

Tabela 2 – Componentes do gel de empilhamento de poliacrilamida na concentração de 5% para a eletroforese SDS-PAGE.

Concentração de poliacrilamida	5%
Solução A (30% de acrilamida e 0,8% de bisacrilamida)	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 mL

A quantidade total de proteína aplicada em cada canaleta foi de 20 µL e de 10 µL, nos géis de separação a 12% e a 18%, respectivamente. Uma canaleta de cada gel foi destinada a aplicação de um padrão de proteínas de alto¹⁴ e baixo¹⁵ peso molecular, respectivamente para os géis de 12% e 18%. Ato contínuo a cuba foi ligada a uma fonte elétrica bipolar¹⁶, com uma corrente elétrica constante de 25 mA e voltagem máxima de 181V/ 2h45'e 216V/2h 15', para os géis de 12% e 18% , respectivamente.

Ao término da corrida eletroforética, os géis foram retirados das placas de vidro e transferidos para recipientes plásticos onde foram corados com coomasie azul brilhante R-250 (**1g de coomasie azul brilhante R-250, 450 mL de metanol, 100 mL de água MilliQ e 450 mL de ácido acético glacial**). A solução de coomasie foi colocada em contato com os géis e em seguida procedeu-se o aquecimento em forno microondas¹⁸ em potência de 100W por 30 segundos. O recipiente foi então colocado em agitador automático¹⁷ onde permaneceu sob constante agitação durante uma hora. A solução de

¹⁴ Full Range Rainbow Recombinant Protein Molecular Weight Markers (10 a 250 kDa), Amersham Bioscience Uppsala, Suécia.

¹⁵ Low Range RNP 755E, Amersham Bioscience - Uppsala, Suécia.

¹⁶ EPS 300 Power Supply, Amersham Bioscience - Uppsala, Suécia.

¹⁷ Rotary Shaker, Biomixer, modelo MOS-1, Brasil

coomasie foi descartada e os géis foram descorados por duas vezes durante 15 minutos com solução descorante (**800 mL água MilliQ, 100 mL metanol e 100 mL de ácido acético glacial**) aquecida em uma potência de 40W, por 30 segundos, sob constante agitação. Uma nova descoloração foi realizada com água destilada, por 20 minutos em potência de 70W e 10 minutos em potência de 100W em forno microondas. Os géis foram alojados em recipientes plásticos contendo água destilada e armazenados em geladeira a uma temperatura de 4°C.

Posteriormente as imagens dos géis foram digitalizadas¹⁸ no Departamento de virologia do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP e analisadas por meio de um software analisador de imagens¹⁹, do Departamento de Física e Biofísica, do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, que por sua vez determinou o peso molecular e a densidade óptica integrada (IOD) para cada amostra de gel.

3.6 - Análise estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas e resultados significativos ao teste de Kruskal-Wallis²⁰. Valores p iguais ou menores que 0,05 foram considerados significativos.

¹⁸ Alpha Ease[®], versão 6.0.0, Alpha Innotech Corporation (1993-2006) -

¹⁹ Image Master, Amersham Bioscience - Uppsala, Suécia.

²⁰ Sigmastat 3.0[®], Systat Software inc – San Jose, CA, EUA.

4. RESULTADOS

4.1 – Avaliações dos parâmetros espermáticos

Não foram observadas diferenças significativas em relação ao volume, motilidade e vigor, em todos os grupos experimentais, ao longo das oito semanas de avaliação ($p>0,05$). A média e o erro padrão de cada grupo, referentes a estes parâmetros, se encontram sumarizadas na Tabela 3.

Tabela 3. Média e erro padrão da média do volume (mL), motilidade (%) e vigor espermático de cães do grupo controle e dos grupos I e II, em todos os períodos avaliados, em todos os períodos avaliados. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.

	Grupo controle	Grupo I (250U)	Grupo II (500U)	P*
Pré-aplicação				
Volume	4,66 ± 0,33	5,5 ± 0,89	4,33 ± 1,20	0,99 0,23 0,23
Motilidade	0,86 ± 3,33	0,88 ± 2,65	0,87 ± 1,76	
Vigor	3,66 ± 0,33	4,00 ± 0,36	4,05 ± 0,09	
2 semanas				
Volume	4,50 ± 0,86	3,80 ± 1,11	4,28 ± 0,41	0,99 0,23 0,23
Motilidade	0,84 ± 2,08	0,91 ± 1,74	0,82 ± 3,25	
Vigor	4,00 ± 0,00	4,2 ± 0,20	3,80 ± 0,01	
4 semanas				
Volume	4,60 ± 0,30	4,00 ± 0,67	4,41 ± 0,65	0,99 0,23 0,23
Motilidade	0,89 ± 2,02	0,89 ± 3,21	0,89 ± 1,77	
Vigor	4,66 ± 0,33	4,00 ± 0,31	4,11 ± 0,13	
8 semanas				
Volume	5,00 ± 0,28	4,60 ± 1,43	4,21 ± 0,55	0,99 0,23 0,23
Motilidade	0,85 ± 2,90	0,89 ± 2,69	0,90 ± 2,20	
Vigor	4,33 ± 0,33	4,40 ± a,24	4,35 ± 0,16	

No que concerne à concentração espermática dos grupos experimentais, houve diferença significativa somente nas avaliações intragrupos. ($p=0,018$).

A média e o erro padrão da média da concentração espermática dos cães dos grupos controle, I e II, antes e após a aplicação de solução salina de NaCl a 0,9% estéril, 250 ou 500U de TB-A, em todos os períodos avaliados se encontram descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Média e erro padrão da média da concentração espermática ($\times 10^6$ por ejaculado) realizada em cães dos grupos controle, I e II, em todos os períodos avaliados. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.

	Grupo controle	Grupo I (250U)	Grupo II (500U)
Pré-aplicação	140,66 \pm 20,21	160,80 \pm 42,04	178,00 \pm 20,16
2 semanas	155,00 \pm 39,68	238,80 \pm 60,40	212,00 \pm 41,12
4 semanas	247,66 \pm 28,99	339,00 \pm 107,18	227,00 \pm 17,50
8 semanas	222,00 \pm 40,52	465,60 \pm 102,41	213,20 \pm 21,07

* Análise de variância para medidas repetidas

4.2 – Avaliação da morfologia espermática

Apesar da ocorrência de discretas alterações na morfologia espermática, não foram observadas diferenças significativas quanto à porcentagem de espermatozoides normais, com defeitos maiores e menores nos grupos controle, I e II, em todos os períodos avaliados ($p>0,05$) (Figura 6 e Tabela 5).

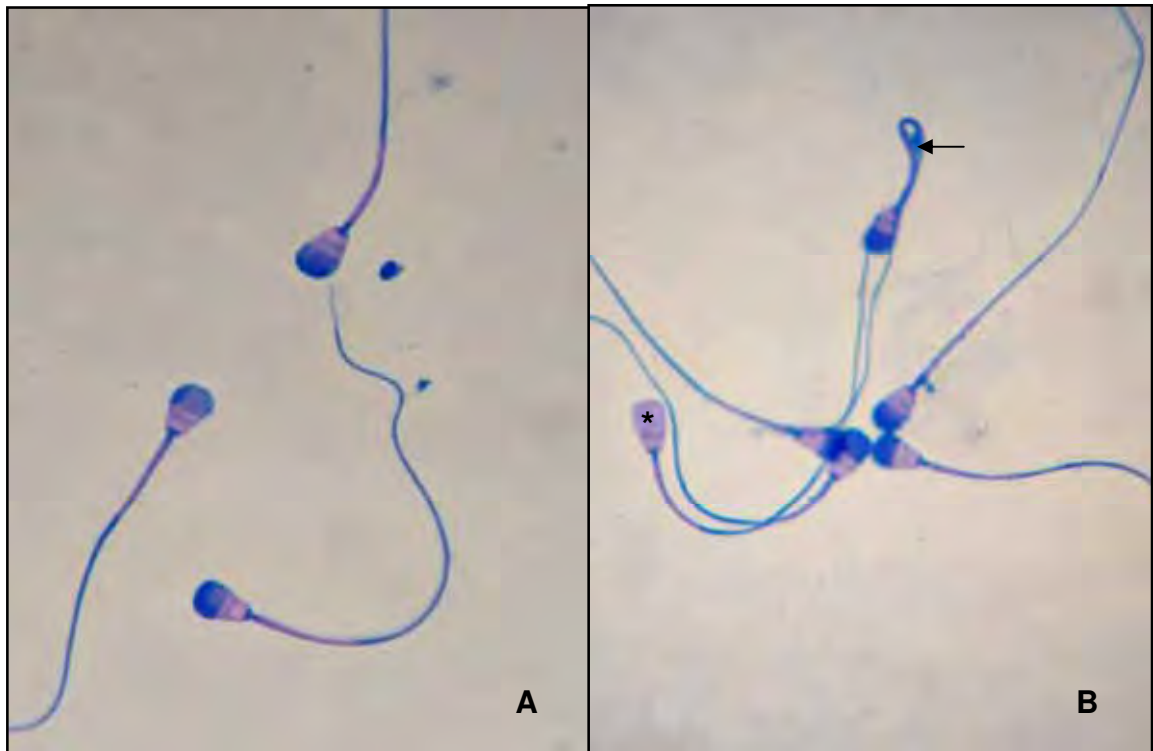


Figura 6. Fotomicrografia de espermatozoides de cão, corados pela coloração de Karras (KA) modificado por PAPA et al. (1986). Células espermáticas sem alterações morfológicas (A) e com acrossomo destacado (*) e cauda fortemente dobrada (seta) (B).

Tabela 5 - Média e erro padrão da média da morfologia espermática dos cães do grupo controle e dos grupos I e II, em todos os períodos avaliados. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.

	Grupo Controle	Grupo I (250U)	Grupo II (500U)	P*
Pré-aplicação				
Normais	0,86 ± 0,04	0,85 ± 0,01	0,80 ± 0,02	0,70
Def. maiores	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,35
Def. menores	0,10 ± 0,03	0,07 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,90
2 semanas				
Normais	0,88 ± 0,06	0,87 ± 0,02	0,81 ± 0,04	0,70
Def. maiores	0,04 ± 0,01	0,03	0,06 ± 0,02	0,35
Def. menores	0,07 ± 0,05	0,09 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,90
4 semanas				
Normais	0,89 ± 0,04	0,89 ± 0,02	0,83 ± 0,03	0,70
Def. maiores	0,03 ± 0,01	0,03	0,04 ± 0,01	0,35
Def. menores	0,07 ± 0,03	0,07 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,90
8 semanas				
Normais	0,88 ± 0,05	0,87 ± 0,02	0,82 ± 0,03	0,70
Def. maiores	0,03	0,05	0,06 ± 0,01	0,35
Def. menores	0,09 ± 0,04	0,07 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,90

*Análise de variância para medidas repetidas

4.3 – Avaliação da integridade de membrana plasmática

4.3.1 – Teste hiposmótico

Ao longo das oito semanas de avaliação, não foi constatada diferença significativa nos grupos controle, GI e GII, ao avaliar a integridade da membrana plasmática por meio do teste hiposmótico ($p > 0,05$). A média e o erro padrão de cada grupo se encontram descritas na Tabela 6.

Tabela 6. Média e erro padrão da média do teste hiposmótico realizado nos animais dos grupos controle, I e II, em todos os períodos avaliados. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.

	Grupo C	Grupo I (250U)	Grupo II (500U)
Pré- aplicação	95,66 ± 0,88	95,80 ± 1,49	94,00 ± 2,51
2 semanas	94,00 ± 2,00	97,00 ± 0,89	95,16 ± 1,24
4 semanas	94,66 ± 1,85	95,20 ± 2,43	92,66 ± 2,56
8 semanas	96,33 ± 0,33	96,200 ± 1,31	97,33 ± 1,22

* Kruskal-Wallis (p=0,41)

4.3.2 – Coloração por sondas fluorescentes

Durante o período de avaliação, não foi constatada diferença significativa nos grupos controle, GI e GII, ao avaliar a integridade da membrana plasmática por meio da coloração por sondas fluorescentes (DIC e IP) ($p > 0,05$). A média e o erro padrão de cada grupo se encontram descritas na Tabela 11 e Figura 7.

Tabela 7. Média e erro padrão da média dos espermatozoides corados pela coloração de sondas fluorescentes [diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e iodeto de propídeo (IP)] dos cães do grupo controle e dos grupos I e II, em todos os períodos avaliados. FCAV- Unesp Jaboticabal SP, 2009.

	Grupo Controle	Grupo I (250U)	Grupo II (500U)	P*
Pré-aplicação				
DIC	0,97 ± 0,03	0,99	0,96 ± 0,02	0,76
IP	0,03 ± 0,03	0,01	0,03 ± 0,02	0,68
2 semanas				
DIC	0,96 ± 0,03	0,99	0,95 ± 0,02	0,76
IP	0,04 ± 0,03	0,01	0,04 ± 0,02	0,68
4 semanas				
DIC	0,94 ± 0,01	0,94 ± 0,02	0,93 ± 0,02	0,76
IP	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,68
8 semanas				
DIC	0,97 ± 0,01	0,92 ± 0,05	0,95 ± 0,02	0,76
IP	0,02 ± 0,01	0,07 ± 0,05	0,05 ± 0,02	0,68

*Kruskall-Wallis

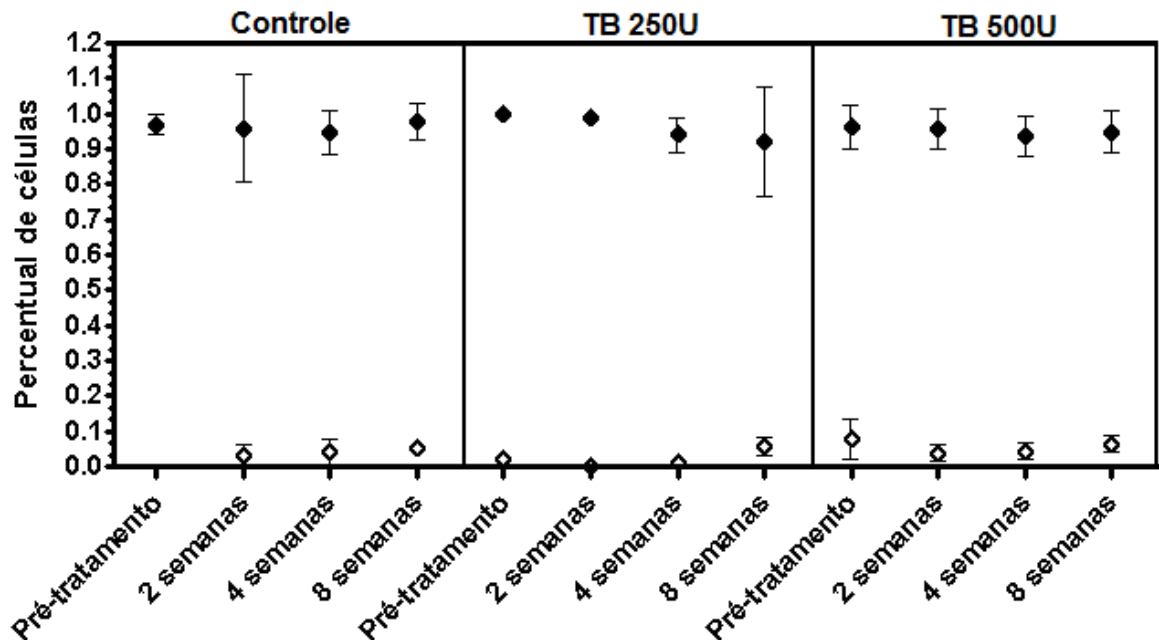


Figura 7. Média e erro padrão da média da coloração por sondas fluorescentes, com os corantes diacetato de carboxifluoresceína (preto) e iodeto de propídeo (branco) dos cães do grupo controle e dos grupos I e II, em todos os períodos avaliados. Jaboticabal - SP, 2009.

*Kruskall-Wallis ($p > 0,05$).

4.4 – Avaliação bioquímica do plasma seminal

4.4.1- Dosagens de proteínas e cloretos totais, cálcio, potássio e sódio

Relativamente às dosagens de proteína e cloretos totais, cálcio, potássio, sódio, não foram encontradas diferenças significativas entre os GC, GI e GII em nenhum dos momentos avaliados ($p > 0,05$). As tabelas de 8 a 12, resumem os resultados das avaliações bioquímicas realizadas no plasma seminal.

Tabela 8. Média e erro padrão da média* dos valores de proteína total (g/dL) do plasma seminal de cães em todos os grupos estudados, em diferentes períodos. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.

	Grupo Controle	Grupo I (250U)	Grupo II (500U)
Pré-aplicação	2,30 ± 0,20	2,03 ± 0,47	2,29 ± 0,26
2 semanas	2,74 ± 0,07	2,82 ± 0,42	2,88 ± 0,30
4 semanas	1,88 ± 0,45	2,99 ± 0,24	2,77 ± 0,43
8 semanas	2,48 ± 0,07	2,44 ± 0,20	2,92 ± 0,37

* Análise de variância para medidas repetidas ($p=0,50$)

Tabela 9. Média e erro padrão da média dos valores de cloretos totais (mmol/dL) do plasma seminal de cães em todos os grupos estudados, em diferentes períodos. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.

	Grupo Controle	Grupo I (250U)	Grupo II (500U)
Pré- aplicação	122,00 ± 13,11	157,66 ± 14,26	141,38 ± 3,12
2 semanas	121,33 ± 13,86	112,16 ± 8,37	124,83 ± 10,39
4 semanas	128,33 ± 39,88	111,16 ± 9,72	151,66 ± 11,91
8 semanas	131,33 ± 0,33	102,83 ± 7,84	131,66 ± 4,47

* Análise de variância para medidas repetidas (p=0,09)

Tabela 10. Média e erro padrão da média dos valores de cálcio (mmol/dL) do plasma seminal de cães em todos os grupos estudados, em diferentes períodos. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.

	Grupo Controle	Grupo I (250U)	Grupo II (500U)
Pré-aplicação	1,95 ± 1,01	0,86 ± 0,11	2,32 ± 0,54
2 semanas	2,63 ± 0,76	1,26 ± 0,23	1,86 ± 0,33
4 semanas	0,90 ± 0,21	1,35 ± 0,19	1,82 ± 0,53
8 semanas	1,53 ± 0,12	1,46 ± 0,26	1,87 ± 0,38

* Análise de variância para medidas repetidas (p= 0,14)

Tabela 11. Média e erro padrão da média dos valores de potássio (mmol/dL) do plasma seminal de cães em todos os grupos estudados, em diferentes períodos. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.

	Grupo Controle	Grupo I (250U)	Grupo II (500U)
Pré-aplicação	7,86 ± 1,15	7,21 ± 0,40	5,81 ± 0,67
2 semanas	9,56 ± 0,73	2,15 ± 1,12	7,96 ± 0,56
4 semanas	9,10 ± 0,10	8,50 ± 0,65	8,30 ± 0,89
8 semanas	9,73 ± 0,61	8,46 ± 0,62	9,30 ± 0,60

* Análise de variância para medidas repetidas (p=0,01)

Tabela 12. Média e erro padrão da média* dos valores de sódio (mmol/dL) do plasma seminal de cães em todos os grupos estudados, em diferentes períodos. Jaboticabal - SP, 2009.

	Grupo Controle	Grupo I (250U)	Grupo II (500U)
Pré-aplicação	151,33 ± 7,21	130,16 ± 6,51	153,50 ± 4,55
2 semanas	142,00 ± 2,00	137,16 ± 2,85	148,83 ± 2,83
4 semanas	137,66 ± 3,84	132,33 ± 2,75	149,00 ± 5,21
8 semanas	149,00 ± 1,00	139,00 ± 4,02	143,66 ± 3,71

*Análise de variância para medidas repetidas (p=0,02)

4.4.2 – Mensuração do pH

Exceto pelo grupo controle pré-tratamento, o valores de pH se mantiveram dentro dos valores de referência considerados normais para a espécie (JONHSTON, 2001). Nenhuma diferença significativa nos valores de pH nos grupos controle GI e GII ($p \leq 0,05$) foram notadas. A média e o erro padrão de cada grupo são demonstrados na Tabela 17, abaixo.

Tabela 13. Média e erro padrão da média dos valores de pH do plasma seminal de cães em todos os grupos estudados, em diferentes períodos. Jaboticabal - SP, 2009.

	Grupo Controle	Grupo I (250U)	Grupo II (500U)
Pré-aplicação	5,85 ± 0,14	6,15 ± 0,16	6,26 ± 0,13
2 semanas	6,14 ± 0,05	6,32 ± 0,17	6,28 ± 0,06
4 semanas	6,19 ± 0,23	6,28 ± 0,10	6,35 ± 0,02
8 semanas	6,36 ± 0,13	6,44 ± 0,12	6,29 ± 0,06

Análise de variância para medidas repetidas ($p=0,55$)

4.5 - Perfil eletroforético

O perfil protéico do plasma seminal dos cães dos grupos controle, GI e GII estão representados nas Tabelas 14 e 15.

No gel de separação de 12% foram identificadas 20 bandas protéicas nos animais dos diferentes grupos, nos diferentes períodos de avaliação (Figuras 8 e 9). Os pesos moleculares variaram de 106,2 a 16,6 kDa e apenas duas bandas, 50 kDa e a de 33,8 kDa estavam presentes em todos os animais, nos períodos pré-tratamento, 2, 4 e 8 semanas da injeção de TB-A ou solução fisiológica.

Já no gel de separação de 18% foram identificadas 10 bandas protéicas dentre os animais dos diferentes grupos, nos diferentes períodos de avaliação (Figuras 10 e 11). Os pesos moleculares variaram de 15,2 a 3,9 kDa e somente duas bandas, uma de 15,2 kDa e outra de 13,2 kDa foram observadas em todos os animais, em todos os períodos de avaliação.

Tabela 14. Médias da densidade óptica integrada (IOD) das bandas protéicas e seus pesos moleculares (kDa) detectadas no gel de separação de 12% do plasma seminal dos cães dos grupos controle, I e II, nos momentos pré-aplicação (Pa), 2, 4 e 8 semanas após a injeção de solução salina de NaCl a 0,9% ou de toxina botulínica do tipo A. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.

Banda	PM	Grupo controle						Grupo I						Grupo II					
		Pa	2ª sem.	4ª sem.	8ª sem.	Pa	2ª sem.	4ª sem.	8ª sem.	Pa	2ª sem.	4ª sem.	8ª sem.	Pa	2ª sem.	4ª sem.	8ª sem.		
B1	106,2	15,9	22,3	26,6	-	68,4	75,7	61,8	43,5	17,8	93,3	59,5	113,4						
B2	103,7	-	-	-	73,6	27,8	17,6	12,8	18,0	49,4	64,0	-							
B3	100,3	19,4	-	-	71,0	51,8	39,7	28,1	17,8	93,3	59,5	113,4							
B4	75,0	-	-	-	49,1	52,0	31,4	11,6											
B5	71,5	55,2	23,7	-	60,7	48,9	31,4	10,2	37,9	30,6	29,2	79,5							
B6	67,0	-	-	-	39,3	65,4	31,4	91,1	51,8	48,0	39,4	21,3							
B7	62,2	-	-	-	23,7	48,9	31,4	28,1	12,3	22,4	34,3	54,9							
B8	50,0	156,4	205,9	286,5	50,0	57,1	31,4	35,3	51,8	216,1	158,2	120,5							
B9	39,2	25,8	28,5	-	-	-	83,6	-	83,6	83,6	86,8	60							
B10	37,1	44,9	70,1	92,8	88,2	93,6	35,8	11,9	-	-	-	-							
B11	35,0	18,7	92,1	121,7	36,8	53,0	45,6	23,6	32,0	119,3	196,3	87,7							
B12	34,4	-	13,9	38,8	-	17,6	-	22,5	-	11,8	32,5	20							
B13	33,8	52,7	47,3	63,4	30,8	40,2	35,6	50,9	53,8	30,2	32,2	48,4							
B14	31,2	-	-	-	65,0	67,9	44,2	25,1	13,3	149,9	159,8	78,5							
B15	30,6	18,7	92,1	121,7	-	28,1	99	23,6	26,4	76,6	46,1	37,9							
B16	26,5	-	-	-	-	23,5	-	-	44,8	95,6	68,7	36,4							
B17	25,0	-	-	-	59,3	47,2	50,1	28,2	49,2	107,4	159,8	90,3							
B18	24,3	-	-	-	79,9	60,2	52,7	39,5	84,4	-	46,9	29,6							
B19	18,1	-	-	-	48,0	37,2	55,2	-	39,2	76,3	82,2	87,7							
B20	16,6	-	-	-	34,1	26,9	38,6	36,0	50,7	46,5	36,0	30,1							

Tabela 15. Médias da densidade óptica integrada (IOD) das bandas protéicas e seus pesos moleculares (kDa) detectadas no gel de separação de 18% do plasma seminal dos cães dos grupos controle, I e II, nos momentos pré-aplicação (Pa), 2, 4 e 8 semanas após a injeção de solução salina de NaCl a 0,9% ou de toxina botulínica do tipo A. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.

Banda	PM	Grupo controle						Grupo I				Grupo II			
		Pa	2ª sem.	4ª sem.	8ª sem.	Pa	2ª sem.	4ª sem.	8ª sem.	Pa	2ª sem.	4ª sem.	8ª sem.		
B21	15,2	222,3	226,3	203,0	114,6	53,3	38,1	54,9	30,7	45,8	83,2	83,6	53,3		
B22	13,2	20,1	40,2	47,1	14,6	35,4	20,7	26,6	39,3	33,8	35,2	41,1	38,3		
B23	11,8	39,7	42,6	32,1	-	59,8	32,4	53,4	13,4	44,4	28,7	13,6	74,1		
B24	10,4	-	-	38,9	35,0	27,3	35,6	41,9	31,5	27,66	23,8	25,7	19,2		
B25	9,9	33,1	-	-	-	24,0	51,9	45,6	74,0	11,3	11,3	29,9	19,7		
B26	8,9	31,4	30,1	52,8	13,0	-	47,1	23,0	34,9	48,6	-	-	-		
B27	7,9	105,6	70,6	18,2	-	88,3	101,6	44,1	59,5	50,1	64,8	-	-		
B28	6,9	56,5	24,8	19,9	-	26,5	28,1	23,1	52,3	25,8	21,7	17,9	30,0		
B29	4,2	160,4	48,5	-	57,2	58,0	99,4	15,6	83,4	90,9	99,5	-	10,3		
B30	3,9	-	-	-	-	30,0	27,9	-	-	42,2	46,1	51,5	29,8		

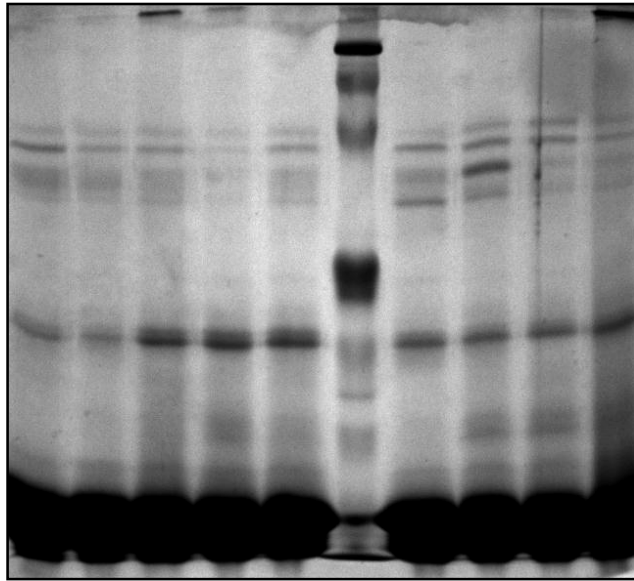


Figura 8 – Imagem do gel de separação 12% de poliacrilamida, evidenciando as bandas protéicas presentes em cada amostra (colunas)

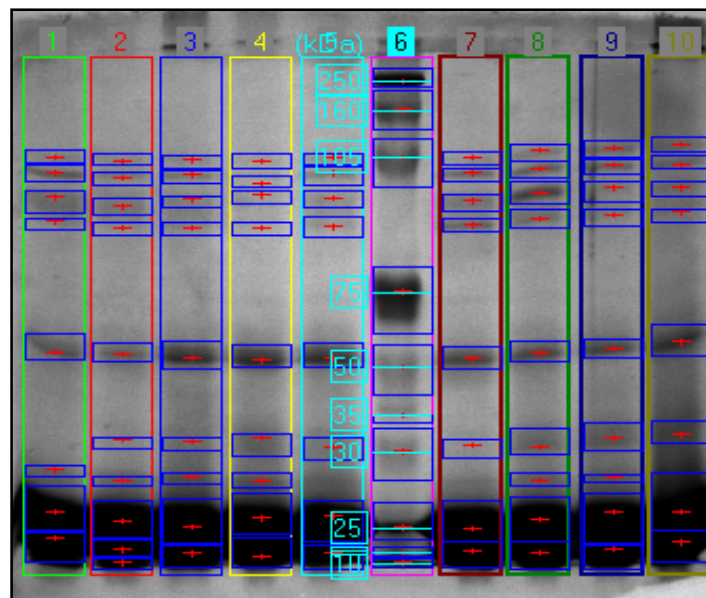


Figura 9 - Imagem do gel de separação de 12% de poliacrilamida no momento da análise pelo software Image Master, evidenciando a coluna do marcador (azul claro), com seus respectivos pesos moleculares (kDa) e as demais colunas com a marcação de cada banda (quadrado azul).

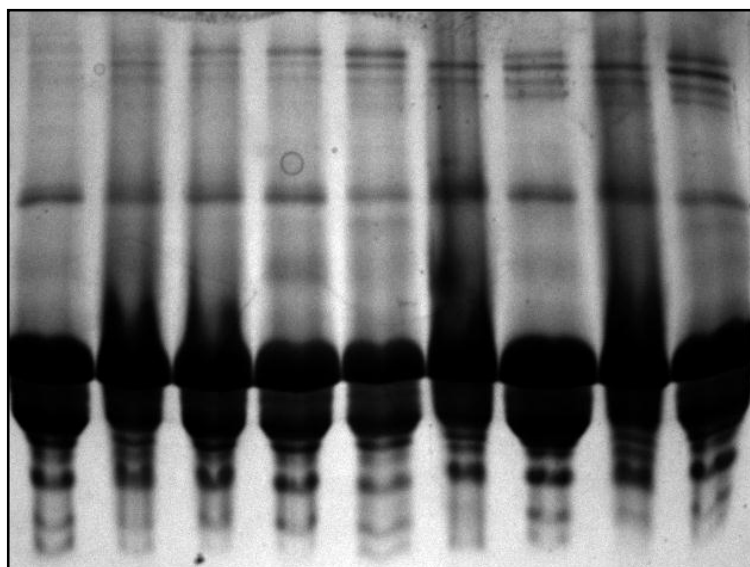


Figura 10 – Imagem do gel de separação de 18% de poliacrilamida, evidenciando as bandas protéicas presentes em cada amostra (colunas)

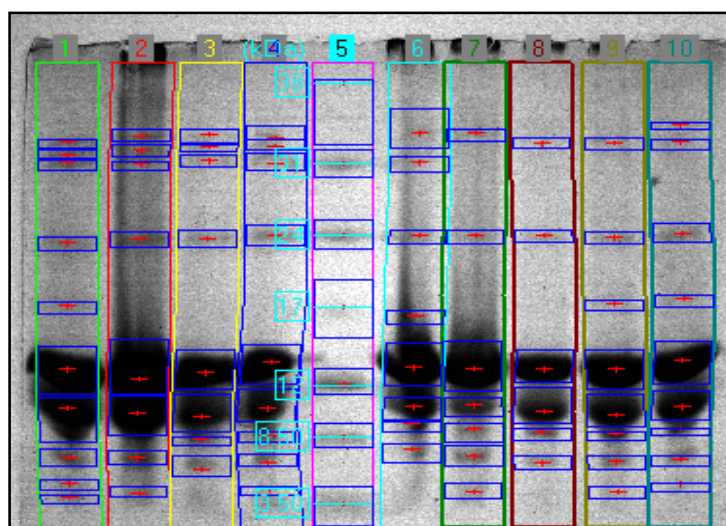


Figura 11 - Imagem do gel de separação de 18% de poliacrilamida no momento da análise pelo software *Image Master*, evidenciando a coluna do marcador (azul claro), com seus respectivos pesos moleculares (kDa) e as demais colunas com a marcação de cada banda (quadrado azul).

Um terço das proteínas apresentaram pesos moleculares inferiores a 16 kDa e dentre elas a banda de 15,2 kDa foi a que obteve maior expressão. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de IOD, entre cada momento de avaliação e entre cada grupo avaliado.

Tabela 16 - Média e erro padrão da média dos valores da densidade óptica (IOD) da banda de 15,2 kDa do plasma seminal de cães em todos os grupos estudados, em diferentes períodos. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.

	Grupo Controle	Grupo I (250U)	Grupo II (500U)
Pré-aplicação	222,2 ± 26,5	128,0 ± 72,4	279,1 ± 52,0
2 semanas	226,7 ± 29,0	158,6 ± 66,9	244,3 ± 91,1
4 semanas	203,3 ± 28,5	158,3 ± 36,4	234,1 ± 79,0
8 semanas	114,5 ± 17,4	136,9 ± 81,2	359,9 ± 38,1

Análise de variância para medidas repetidas ($p=0,073$)

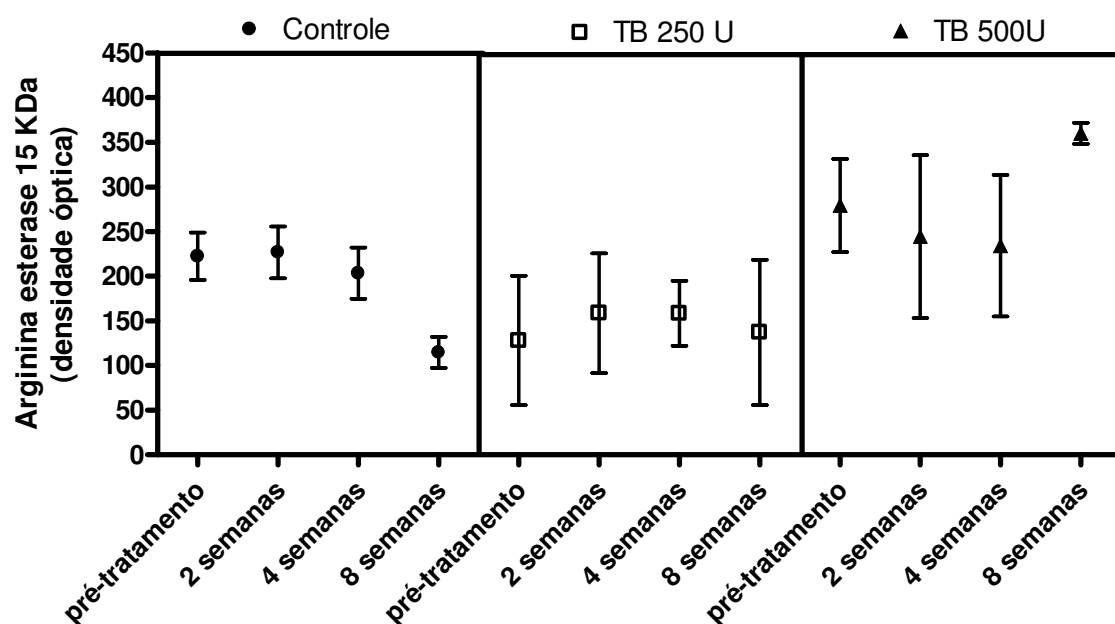


Figura 12 - Média e erro padrão da média dos valores da densidade óptica (IOD) da banda de 15,2 kDa do plasma seminal de cães em todos os grupos estudados, em diferentes períodos. FCAV- Unesp Jaboticabal - SP, 2009.

5 - DISCUSSÃO

Ainda que KRAWIEC & HELFLIN (1992) tenham relatado existir maior prevalência da HPB em animais de raça, como Pastor Alemão e Doberman Pinscher, nossas observações clínicas revelam a existência de grande incidência desta afecção em animais sem raça definida, extremamente comum em nosso país, ademais a literatura consultada não fornece subsídios no sentido de haver correlação entre raça e a ocorrência de HPB; fato este que em nossa opinião se contrapõe a afirmação de KRAWIEC & HELFLIN (1992).

Outro aspecto que nos parece importante destacar é a ocorrência de sinais de HPB em animais jovens a partir de dois anos de idade, conforme descrito por JOHNSTON et al. (2001) e SIRINARUMITR et al. (2001). De outra parte, autores com WINTER et al. (1995); IGUER-OUADA & VERSTEGEN, (1997); MURAKOSHI et al., 1998; SIRINARUMITR et al., 2001; SOUZA, 2004, independente da raça, citam ser a presença de HPB mais frequente e com importância clínica em animais a partir dos cinco anos de idade, afirmações estas com as quais concordamos. No entanto, os animais, em nosso atendimento, apresentam sintomatologia clínica com maior frequência a partir desta faixa etária. Contudo, por ser este processo de evolução crônica, é bastante factível que seu início tenha sido precoce como referido por JOHNSTON et al. (2001) e SIRINARUMITR et al. (2001).

Cães com HPB podem ser assintomáticos (KRAWIEC & HEFLIN, 1992); afirmação da qual, pela nossa experiência clínica compartilhamos. Entretanto, JOHNSTON (2001) descreveu a ocorrência de gotejamento com coloração amarelada a sanguinolenta, causado por cistos intraparênquimais, fato este que constatamos em todos os cães de nosso estudo, sendo que apenas três deles apresentaram gotejamento. Outras condições clínicas como, tenesmo, disúria,

dor abdominal e até mesmo infertilidade decorrente do aumento da próstata podem ocorrer segundo BRENDLER et al. (1983), JOHNSTON et al. (2001), READ & BRYDEN (1995), porém nos animais por nós avaliados não as observamos, o que nos permite inferir que isto pode decorrer da resistência individual de cada animal, associada ao tamanho da próstata.

O diagnóstico definitivo de HPB é firmado utilizando-se biópsia prostática, que causa injúria tecidual e eventualmente hematúria (JOHNSTON et al, 2001; SMITH, 2008). Assim, como um dos nossos objetivos era o de obtermos a composição bioquímica e protéica do plasma seminal, optamos por utilizar a ultrassonografia associada à anamnese, para estabelecer o diagnóstico presuntivo e assim evitar lesão da glândula e o desencadeamento da liberação de mediadores químicos, os quais eventualmente poderiam vir a comprometer nossas análises. Nenhum dos autores consultados descreveu este tipo de procedimento e provavelmente em nenhum deles houve a preocupação em realizar este tipo de avaliação.

Podemos afirmar que a metodologia empregada para a aplicação da toxina botulínica é de fácil execução, uma vez que MARIA et al. (2003) CHUANG et al (2005) e MOSTACHIO (2008) não descreveram intercorrências durante este processo. Ainda, preconizamos somente um ponto de aplicação em cada lobo prostático, o que corrobora com o descrito por MOSTACHIO (2008), porém diverge da metodologia empregada por MARIA et al. (2003), CHUANG et al. (2005), KUO (2005) RUSNACK & KAPLAN (2005) ANTUNES et al. (2007) e CHUANG & CHANCELLOR, 2007, que descrevem a aplicação da TB-A no homem, em mais de um ponto em cada lobo. Contudo, apesar desta divergência quanto ao método de aplicação empregado, podemos afirmar que a dispersão da neurotoxina não foi comprometida, pois de acordo com AOKI (2001), a ação do fármaco ocorre em um raio de aproximadamente 3 cm. Portanto, acreditamos que além do método empregado facilitar o procedimento e diminuir o número de perfurações na glândula, ele reduz o tempo que o animal permanece anestesiado, restringindo os riscos deste procedimento. Excetuando-se o homem, para o cão, dos autores consultados, existe unanimidade na

escolha de um procedimento anestésico geral e em nosso caso, utilizamos metodologia similar à descrita por MOSTACHIO (2008) com excelentes resultados. Entretanto, acreditamos que na dependência do grau de docilidade do animal poder-se-á utilizar um tranquilizante associado à anestesia epidural, tornando este procedimento ainda mais seguro e rápido.

Em teoria, a ampla vascularização da glândula prostática poderia facilitar a difusão sistêmica da toxina, porém a injeção da TB-A não gerou sinais ou sintomas de botulismo, semelhantemente ao descrito por MARIA et al. (2003) e CHUANG et al (2005) no homem e MOSTACHIO (2008) em cães. No presente estudo, constatamos a ocorrência de hematúria após a injeção da TB-A, similar ao descrito por CHUANG et al. (2005) que observaram presença de sangue na urina e disúria em três pacientes, após o procedimento. Apesar do método de aplicação ter sido feito em espécies distintas (homem e cão), acreditamos que o surgimento deste sinal clínico nas primeiras 24 horas da administração da toxina, pode ter sido devido à lesão traumática de pequenos vasos. Acreditamos que este tipo de lesão possa ser minimizada com o treinamento do operador, uma vez que observamos sangramento nos três primeiros animais avaliados.

SPOSITO (2004) descreveu a ocorrência de ligeiro decréscimo dos parâmetros seminais de ratos após a administração de altas doses da toxina botulínica do tipo A. Porém, assim como MOSTACHIO (2008) não foram constatadas alterações nos parâmetros seminais, como volume, motilidade e vigor espermáticos, de cães tratados com 250 e 500U TB-A. Ainda, apesar dos valores obtidos manterem-se dentro da normalidade para a espécie (JOHNSTON et al., 2001; FELDMAN & NELSON, 2004), observamos índices significativos entre os momentos avaliados intra, mas não entre grupos. Portanto, tais achados nos permite acreditar em falha no condicionamento para colheita de sêmen e não pela ação da neurotoxina botulínica; o que nos permite inferir, supor, que a utilização da TB-A possa vir a ser importante terapia alternativa para o tratamento de HPB, especialmente em animais reprodutores.

O plasma seminal exerce importante papel na maturação do espermatozóide, através de processos enzimáticos, de modificação da

superfície espermática, assim como contém ampla variedade de componentes bioquímicos, muitos dos quais são relativamente específicos para a regulação da função espermática (PÉREZ-PÉ et al. 2001). Em nosso estudo, os valores de pH da terceira fração do ejaculado foram considerados normais para a espécie conforme descrito por JONHSTON et al., 2001; excetuando-se a avaliação feita, no período de pré-tratamento, para os animais do grupo controle, onde obteve-se um valor médio de pH de 5,85, inferior aos demais grupos I e II, que apresentaram valores médios de pH de 6,15 e 6,26, respectivamente. Esta diferença nos valores médios do pH pode ter ocorrido pela contaminação do ejaculado por urina, uma vez que, de início alguns animais eram extremamente agitados e supostamente podem ter urinado no momento da colheita.

No que diz respeito às concentrações de sódio, potássio, cálcio e cloretos totais do plasma seminal após o tratamento com ambas as doses de 250 e 500U de TB-A. No entanto, os valores médios de cloretos totais foram inferiores aos descritos por BARLETT et al (1962), assim como a concentração de potássio quando comparada as descritas por JAMES et al. (1979), ENGLAND et al (1990) e SOUZA et al.(2003). Já os níveis de sódio se mantiveram dentro dos valores observados por ENGLAND et al (1990) e SOUZA et al. (2003). Por fim, os valores de cálcio apresentaram valores cinco vezes superiores aos descritos por ENGLAND et al. (1990).

No que concerne à concentração de proteína total, o mesmo autor refere valores de proteína total superiores na segunda fração do ejaculado, sendo que os valores médios encontrados para a espécie canina foram de 14,4 g/L (1,44g/dL), 42,5 g/L (4,25 g/dL) e 30,7 g/L (3,07 g/dL) respectivamente para a primeira, segunda e terceira fração. Já SOUZA et al (2006) descreveram níveis médios de proteína presentes no plasma seminal de 2,19 g/dL pré-vasectomia e de 2,32 g/dL pós-vasectomia. Diferentemente de SOUZA et al. (2006) não observamos mudanças significativas na concentração de proteína total antes e depois dos tratamentos, assim como entre os grupos controle, grupo I e II, porém o valor médio de proteína para a terceira foi muito semelhante ao descrito por este autor e inferior ao observados por ENGLAND et al. (1990). Tendo isto

em vista, como os animais do grupo controle também apresentaram tais alterações no perfil bioquímico, acredita-se que esta discrepância de alguns valores, se deva principalmente às diferenças quanto à metodologia empregada para a dosagem destes componentes bioquímicos.

Na avaliação do perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal SOUZA & LOPES (2002), em estudo utilizando 5 cães, identificaram 25 bandas no plasma seminal, com pesos moleculares variando entre 136 e 3,9 kDa. Em outro estudo, envolvendo um maior número de animais (n=20), foram identificadas 37 bandas com peso moleculares de 100,6 a 3,6 kDa (SOUZA, 2003). MARTINS (2005) em estudo avaliando a sazonalidade sobre a função testicular de cães, identificou um total de 31 bandas, com pesos moleculares entre 139,63 a 2,71 kDa. No presente estudo, identificamos 31 bandas, o que corrobora com os achados de MARTINS (2005), que mesmo com um número inferior de animais constatou o mesmo número de bandas, porém com pesos moleculares diferentes. No que concerne aos pesos moleculares das bandas protéicas, nossos dados foram muito semelhantes aos descritos por SOUZA (2003). Entretanto, somente 30% das bandas apresentaram pesos moleculares inferiores a 16,6 kDa, ao contrário dos achados de SOUZA. (2003), que constatou a presença de 85% das bandas com pesos moleculares abaixo de 17 kDa. Uma das hipóteses é que a concentração do gel de separação possa ter influenciado o local de formação das bandas protéicas, visto que SOUZA (2003) utilizou concentrações de poliacrilamida de 13% e 22% e no presente estudo foram utilizados géis nas concentrações de 12% e 18% de poliacrilamida. Outrossim, a formação de “arrastes” nos géis do presente estudo, pode ter comprometido a leitura do mesmo, uma vez que, não houve a separação adequada das bandas.

A arginina esterase também é conhecida como proteína específica prostática canina (CPSE), possui ação enzimática e é encontrada em altas concentrações no fluido prostático do cão (Mc ENTEE et al., 1987). De acordo com CALVETE et al. (1995), a CPSE possui certa homologia às proteínas ligadoras de heparina (HBPs) de equinos. As HBPs têm sido associadas à

fertilidade em algumas espécies (SOUZA et al, 2006). Acreditamos que estas proteínas participam ativamente do processo de fertilização, ligando-se aos glicosaminoglicanos (GAGs), a heparina e a outras proteínas do trato reprodutor, sendo correlacionadas ao processo de capacitação e reação acrossomal (MILLER et al., 1990). Tendo isso em vista, identificamos altas concentrações da banda de 15,2 kDa, que supostamente possa ser uma subunidade da arginina esterase de acordo com SOUZA. (2003). Contudo, não foram observadas alterações significativas nos valores da densidade óptica desta proteína tanto no grupo controle, como nos grupos I e II que receberam a injeção de toxina botulínica do tipo A. Portanto, se realmente a proteína de 15,2 kDa for uma subunidade da arginina esterase, a TB-A não interfere nas funções exercidas pela mesma.

6- CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e nas condições em que este estudo foi realizado, podemos concluir que:

- O uso da TB-A não interferiu na fertilidade *in vitro* de cães.
- A membrana plasmática do espermatozóide manteve-se preservada após o tratamento com TB-A e administração do fármaco não resultou em mudanças significativas nos parâmetros espermáticos como, volume, vigor, motilidade, concentração e morfologia espermáticas.
- A aplicação da TB-A não altera o perfil bioquímico do plasma seminal.
- O perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal manteve-se inalterado após a aplicação neurotoxina assim como a densidade óptica da proteína de 15,2 kDa.

Por fim, apesar do custo significativo da TB-A no mercado nacional e da necessidade da reaplicação do fármaco após 6 meses da aplicação, esta é uma droga segura para animais destinados a programas de criopreservação de gametas e reprodução. Ainda, estudos avaliando taxas de prenhez, viabilidade de embriões e filhotes oriundos de fêmeas inseminadas por machos tratados com TB-A, seriam imprescindíveis para a avaliação da fertilidade dos animais submetidos a este tipo de tratamento.

7. REFERÊNCIAS

AMANN, R. P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **Journal of Andrology**, Philadelphia, v.10, n. 2, p.89- 98, 1989.

ANTUNES, A.A. et al. Botulinim toxin for the treatment of lower urinary tract symptoms due to benign prostatic hyperplasia. **Nature Clinical Practice Urology**, New York, v. 4, n.3, p. 155 -160, 2007.

AOKI, K. R. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. **Toxicon**, Oxford, v.39, n.12, p.1815-1820, 2001a.

AOKI, K. R. Pharmacology and immunology of botulinum toxin serotypes. **Journal of Neurology**, BELLIN, v. 248, suppl.1, p.3-10, 2001b.

AURICH, J. E. et al. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, New York, v. 46, n. 5, p.791- 797, 1996.

BAMBERG-THALÉN, B.; LINDE-FORSBERG, C. Treatment of canine benign prostatic hyperplasia with medroxyprogesterone acetate. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v.29, p.221-226, 1993.

BARTLETT, D. J. Studies on dog semen II – Biochemical characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, Colchester, v.3, p.190-205, 1962.

BARSANTI, J. A. Prostatic hyperplasia: medical therapy. **Proceedings American Clinical Veterinary Internal Medicine**, v.17, p.536-538, 1999.

BARSANTI, J. A.; FINCO, D. R. Medical management of canine prostatic hyperplasia. In: BONAGURA, J. D.; KIRK, R. W. **Current veterinary therapy XII**. Philadelphia: Saunders, 1995. p.1033-1034.

BARSANTI, J. A.; FINCO, D. R. Moléstias prostáticas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.). **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997. p. 2294-2325.

BARTSCH, G. et al. Correlation of biochemical (receptors, endogenous, tissue hormones) and quantitative morphologic (stereologic) findings in normal hyperplastic human prostates. **Journal of Urology**, New York, v.137, n.3, p.559-564, 1987.

BASINGER, R. R. et al. Próstata. In: SLATTER, D. (Ed.). **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1998. p.1607-1628.

BELLIN, M.E. et al Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility on bulls. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.74, p.173-182, 1996.

BERRY, S. J. et al. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. **The Journal of Urology**, New York, v.132, n.3, p.474-479, 1984.

BLOCH, W. et al. Distribution of nitric oxide synthase implies a regulation of circulation, smooth muscle tone, and secretory function in the human prostate by nitric oxide. **The Prostate**, New York, v.33, n.1, p. 1-8, 1997.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristicsperm defects ans a proposal fo a new classification of 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 eltrophoresis under denaturing conditions. In: _ (Eds). **Protein Methods**. New York: Wiley-Liss, 1996, p.107-54.

BORODIC, G. et al. Botulinum toxin therapy, immunologic resistance, and problems with available materials. **Neurology**, Minneapolis, v.46, n.1, p.26-29, 1996.

BRANDON, C.I., HEUSNER, G.L., CAUDLE, A.B, FAYRES-HOSKEN, R.A. Two-dimensional polyacrylamide gel eletrophoresisof equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v.52. p.863-73, 1999.

BRENDLER, C. B. et al. Spontaneous benign prostatic hyperplasia in beagle. Age-associated changes in serum hormone levels, and the morphology and secretory function of the canine prostate. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v.71, n.5, p.1114-1123, 1983.

CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55 kDa fertility associated protein in Holstein bulls. **Biology Reproduction**, v.57, p.1293-1301, 1997.

CARLIN, J. R. et al. Disposition and metabolism of finasteride in dogs. **Drug Metabolism and Disposition**, Baltimore, v.25, n.1, p.100-109, 1997.

CARSON III, C.; RITTMASER, R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. **Urology**, New York, v.61, suppl.4a, p.2-7, 2003.

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, p.31-34, 1998.

CHANDONNET, L.; ROBERTS, K.D.; CHAPDELAIN, A.; MANJUNATH, P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v.26, p.313-318, 1990.

CHAPDELAIN, P.; DUBE, J. Y.; FRENETTE, G.; TREMBLAY, R.R. Identification of arginine esterase as the major androgen-dependent protein secreted by dog prostate and preliminary molecular characterization in seminal plasma. **Journal of Andrology**, v.5, p.206-210, 1984.

CHIA, S.E.; ONG, C.N.; CHUA, L.H.; HO, L.M.; TAY, S.K. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. **Journal of Andrology**, v.21, n.1, p.53-57, 2000.

CHUANG, Y.; et al. Botulinum toxin type A improves benign prostatic hyperplasia symptoms in patients with small prostates. **Urology**, New York, v.6, n.4, p.775-779, 2005

CHUANG, Y. C. et al Sustained beneficial effects of intraprostatic botulinum toxin type A on lower urinary tract symptoms and quality of life in men with benign prostatic hyperplasia. **BJU International**, Oxford, v.98, n.5, p.1033-1037, 2006a.

CHUANG, Y. C. et al. Novel action of botulinum toxin on the stromal and epithelial components of the prostate gland. **The Journal of Urology**, New York, v.175, n.3, p.1158-1163, 2006b.

CHUANG, Y. C.; et al., Intraprostatic injection of botulinum toxin type-A relieves bladder outlet obstruction in human and induces prostate apoptosis in dogs. **BMC Urology**, London, v.6, n.12, 2006c.

COCHRAN, R. C.; EWING, L. L.; NISWENDER, G. D. Serum levels of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin, testosterone, 5 α -dihydrotestosterone, 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol, 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol, and 17 β -estradiol from male beagles with spontaneous or induced benign prostatic hyperplasia. **Investigative Urology**, v.19, n.3, p.142-147, 1981.

COCKETT, A. T. et al. Relationship of neuroendocrine cells of prostate and serotonin to benign prostatic hyperplasia. **Urology**, New York, v.42, n.5, p.512-519, 1993.

COHEN, S. M. et al. Comparison of the effects of new specific azasteroid inhibitors of steroid 5 α -reductase on canine hyperplastic prostate: suppression of prostatic DHT correlated with prostate regression. **The Prostate**, New York, v.26, n.2, p.55-71, 1995.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. The male genital tract. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. (Ed.). **Pathological basis of disease**. 6.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999. p.1011-1034.

COURT, E. A. et al. Effects of delmadinone acetate on pituitary-adrenal function, glucose tolerance and growth hormone in male dogs. **Australian Veterinary Journal**, Sydney, v.76, n.8, p.555-560, 1998.

CUNHA, I.C.N.; LOPES, M.D.; ZUCCARI; C.E.S.N. Padronização da técnica fluorescente para 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.

DAVLETOV, B.; BAJOHRS, M.; BINZ, T. Beyond Botox: advantages and limitations of individual botulinum neurotoxins. **Trends in Neurosciences**, Amsterdam, v.28, n.8, p.446 – 452, 2005.

DE PAIVA, A. et al. Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, n.6, p.3200-3205, 1999.

DEKLERK, D. P. et al. Comparison of spontaneous and experimentally induced canine prostatic hyperplasia. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v.64, n.3, p.842-849, 1979.

DOGGWEILER, R. et al. Botox-induced prostatic involution. **The Prostate**, New York, v.37, n.1, p.44-55, 1998.

DOLLY, J. O. Therapeutic and research exploitation botulinum neurotoxins. **European Journal of Neurology**, Oxford, v.4, suppl. 2, p.s5-s10, 1997.

DORFMAN, M.; BARSANTI, J. A. Diseases of the canine prostatic gland. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.17, p.791-811, 1995.

DRESSLER, D.; SABERI, F. A. Botulinum toxin: mechanisms of action. **European Neurology**, Basel, v.53, p.3 - 9, 2005.

DUBÉ, J.Y. Prostatic kalikreins: biochemistry and physiology. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.107, p.13-20,1994.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. A pelve e o órgãos dos reprodutores dos carnívoros In: DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1997. p.351 – 356p

ENGLAND, G. C. W., ALLEN, W. E., MIDDLETON, D. J. An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. **Research Veterinary Science**, Oxford, v.49, p.66-70, 1990.

EWING, L. L.; BERRY, S. J.; HIGGINBOTTON, E. G. Dihydrotestosterone concentration of beagle prostatic tissue: effect of age and hyperplasia. **Endocrinology**, Oxford, v.113, n.6, p.2004-2009, 1983.

FALLER, B.; FARLEY, D.; NICK, H. Finasteride: a slow-binding 5 α -reductase inhibitor. **Biochemistry**, Washington, v.32, n.21, p.5705 -5710, 1993.

FEENEY, D. A. et al. Canine prostatic disease – comparison of radiographic appearance with morphologic and microbiologic findings: 30 cases (1981-1985). **Journal of American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v.190, n.8, p.1018-1026, 1987.

FRENETTE, G. ; DUBE, J.Y. ;LACOSTE, D. ; TREMBLAY, R.R. Radiomunoassay in blood plasma of arginine esterase: the major secretory product of dog prostate. **Prostate**, v.10, p.145-152, 1987.

FULTON, J. E. Botulinum toxin. The Newport Beach experience. **Dermatologic Surgery**, New York, v.24, n.11, p.1219-1224, 1998.

GARNER, D. L. et al. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of reproduction**, New York, v.34, n.1, p.127 – 138, 1986.

GERENA, R.L. et al. Identification of a fertility associated protein in Bull seminal plasma as a lipocalin-type prostaglandin D synthetase. **Biology of reproduction**, New York, v.58, n.1, p.826 – 833, 1998.

GKONOS, P.J.; KRONGRAD, A.; ROOS, B.A. Neuroendocrine peptides in the prostate. **Urological research**, BELLIN, v. 23, n. 2, p. 81-87, 1995.

GÖSCHEL, H. et al. Botulinum A toxin therapy: neutralizing and nonneutralizing antibodies - therapeutic consequences. **Experimental Neurology**, Orlando, v.147, n.1, p.96-102, 1997.

GUERCINI, F. et al., Intraprostatic botulinum toxin injection in patients with severe benign prostatic hyperplasia a multicenter feasibility study. **Journal of Urology**, New York, v.173 (suppl.), p.376-377, 2005.

HAMAMAH, S.; GATTI, J.L.; Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. **Human Reproduction**. Oxford, v.13, suppl 4, p.20-30, 1998.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Colchester, v.88, n.1, pp. 343-352, 1990.

HARPER, M.; FOWLER, C.J.; DASGUPTA, P. Botulinum toxin and its application in the lower urinary tract. **BJU International**, Oxford, v.93, n.6, p.702-706, 2004.

HEDLUND, C.S. Cirurgia dos sistemas reprodutivo e genital. In: FOSSUM, T.W. Cirurgia de pequenos animais, São Paulo, Editora Roca, 2002. p.571-635.

HEDLUND, H.; ANDERSSON, K. E.; LARSSON, B. Alpha-adrenoceptors and muscarinic receptors in the isolated human prostate. **The Journal of Urology**, New York, v.134, n.6, p.1291-1298, 1985.

HIGGINS, J. R.; GOSLING, J. A. Studies on the structure and intrinsic innervation of the normal human prostate. **The Prostate**, New York, suppl.2, p.5-16, 1989.

HUANG, W.; FOSTER, J. A.; ROGACHEFSKY, A. S. Pharmacology of botulinum toxin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v.43, n.2, p.249-259, 2000.

HUMEAU, Y et al. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. **Biochimie**, Paris, v. 82, n. 5, p. 427 - 446, 2000.

HUGHES, R.; WHALER, B. C. Influence of nerve-ending activity and of drugs on the rate of paralysis of rat diaphragm preparations by Cl. botulinum type A toxin. **The Journal of Physiology**, Oxford, v.160, p.221-233, 1962.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. P. Effect of finasteride (Proscar MSD) on seminal composition, prostate function and fertility in male dogs. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, Cambridge, v.51, p.139-149, 1997.

INAMASSU, A.; VECHI, E.; LOPES, M.D. Viabilização do teste hipo-osmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.302-304, 1999.

ISAACS, J. T.; COFFEY, D. S. Changes in dihydrotestosterone metabolism associated with the development of canine benign prostatic hyperplasia. **Endocrinology**, Chevy Chase, v.108, n.2, p.445-453, 1981.

JAMES, R.W.; HEYWOOD, R.; STREET, A. E. Biochemical observations on Beagle dog semen. **The Veterinary Record**, London, v.104, n.21, p.1343- 1349, 1997.

JANULIS, L.; LEE, C. Prostate gland. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, 1999. p.77-85.

JEYEDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ- PELAEZ, M. Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, Colchester v.70, n.1, p.219- 228, 1984.

JOHNSTON, S. D. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.21, n.3, p.545-551, 1991.

JOHNSTON, S. D. et al. Prostatic disorders in the dog. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.60-61, n.1-3, p.405-415, 2000.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. Disorders of the canine prostate. In: JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: Saunders, 2001. p.337-355.

KAMPA, M. et al. The opioid agonist ethylketocyclazocine reverts the rapid, non-genomic effects of membrane testosterone receptors in the human prostate LNCaP cell line. **Experimental Cell Research**, Orlando, v.294, n.2, p. 434 - 445, 2004.

KARSENTY, G. et al. Toxines botuliques: applications urologiques. **Progrès en Urologie**, Paris, v.16, n.3, p.263-274, 2006.

KAWAKAMI, E. et al. Comparison of the effects of chlormadinone acetate-pellet implantation and orchidectomy on benign prostatic hypertrophy in the dog. **International Journal of Andrology**, Philadelphia, v.18, n.5, p.248-255, 1995.

KAWAKAMI, E. et al. Effects of oral administration of chlormadinone acetate on canine prostatic hypertrophy. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokio, v. 55, n.4, p.631-635, 1993.

KIM, K.S. et al. Effect of muscle activity and botulinum toxin dilution volume on muscle paralysis. **Developmental Medicine and Child Neurology**, London, v.45, p.200, 2003.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L. Fertility associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1202-1207, 1993.

KLAUSNER, J. S. et al. Recent developments in the diagnosis and treatment of HPB and prostatic carcinoma. In: AMERICAN COLLEGE VETERINARY MEDICINE CONGRESS, 1994, **Proceedings...Pomona: American College Veterinary Medicine Congress**, 1994. p. 547-548.

KRAUSE, D. Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen Bedeutung der Befunde. Tese de livre docência. Tierärztliche Hochschule, Hannover, 1966. 165p.

KUMAR, V. L.; MAJUMDER, P. K. Prostate gland: structure, functions and regulation. **International Urology and Nephrology**, Akademiai Kiadó, v.27, n.3, p.231-243, 1995.

KUO, H. C. Urodynamic evidence of effectiveness of botulinum A toxin injection in the treatment of detrusor overactivity refractory to anticholinergic agents. **Urology**, New York, v.63, n.5, p. 868-872, 2004.

KUO, H. C. Effect of botulinum A toxin in the treatment of voiding dysfunction due to detrusor underactivity. **Urology**, New York, v.61, n.3, p.550-554, 2003.

KUO, H. C. Prostate botulinum A toxin injection – an alternative treatment for benign prostatic obstruction in poor surgical candidates. **Urology**, New York, v.65, n.4, p.670-674, 2005.

KUO, H. C. Recovery of detrusor function after urethral botulinum A toxin injection in patients with idiopathic low detrusor contractility and voiding dysfunction. **Urology**, New York, v.69, n.1, p.57-62, 2007.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-5, 1970.

LAROQUE, P. A. et al. Effects of chronic oral administration of a selective 5 α -reductase inhibitor, finasteride, on the dog prostate. **The Prostate**, New York, v.24, n.2, p.93-100, 1994.

LAROQUE, P. A. et al. Quantitative evaluation of glandular and stromal compartments in hyperplastic dog prostates: effect of 5-alpha reductase inhibitors. **The Prostate**, New York, v.27, n.3, p.121-128, 1995.

LARSON, T.R. et al. Intraprostatic injection of botulinum toxin in the treatment of symptomatic LUTS, including sequential MRIS for accurate changes in size of the prostate. **The Journal of Urology**, New York, v. 173, suppl. 1, p. 376 – 377, 2005.

LATTIMER, J. C. The prostate gland. In: THRALL, D. E. (Ed.). **Textbook of veterinary diagnostic radiology**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p.499-511.

LEE, C.; KOZLOWSKI, J. M.; GRAYHACK, J. T. Intrinsic and extrinsic factors controlling benign prostatic growth. **The Prostate**, New York, v. 31, n. 2, p. 131-138, 1997.

LEPOR, H.; KUCHAR, M. J. Characterization and localization of the muscarinic cholinergic receptor in human prostatic tissue. **The Journal of Urology**, New York, v.132, n.2, p.397-402, 1984.

LI, L.; SINGH, B. R. Isolation of synaptotagmin as a receptor for types A and E botulinum neurotoxins and analysis of their comparative binding using a new microtiter plate assay. **Journal of Natural Toxins**, Fort Collins, v.7, n.3, p.215-226, 1998.

LI, L.; SINGH, B. R. Spectroscopic analysis of pH-induced changes in the molecular features of type A botulinum neurotoxin light chain. **Biochemistry**, Washington, v.39, n.21, p.6466-6474, 2000.

LIN, A. T. et al. Effects of botulinum toxin A on the contractile function of dog prostate. **European Urology**, Amsterdam, v.52, n.2, p.582-589, 2007.

LOWSETH, L. A.; et al. Age-related in the prostate and testes of the beagle dog. **Veterinary Pathology**, Middletown, v.27, n.5, p.347-353, 1990.

MAGISTRINI, M.; et al. New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry . **Theriogenology**, New York, v.48, n.7, p.1229 – 1235, 1997.

MARIA, G. et al. Relief by botulinum toxin of voiding dysfunction due to prostatitis. **Lancet**, London, v.352, n.9128, p.625, 1998.

MARIA, G. et al. Relief by botulinum toxin of voiding dysfunction due to benign prostatic hyperplasia: results of a randomized, placebo-controlled study. **Urology**, New York, v.62, n.2, p.259-265, 2003.

MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; LOPES, M.D. Eletroforese das proteínas do fluido epididimal canino: Dados preliminares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.2, p. 72-75, 2002.

MARTINS, M.I.M. **Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães**. 2005. 122p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

MATARASSO, S. L. Complications of botulinum A exotoxin for hyperfunctional lines. **Dermatologic Surgery**, New York, v.24, n.4, p.1249-1254, 1998a.

MATARASSO, S. L. The role of clostridium botulinum: a neurotoxin in clinical dermatology. **The Western Journal of Medicine**, San Francisco, v.169, n.4, p.226, 1998b.

MCENTEE, M.; ISAACS, W.; SMITH, C. Adenocarcinoma of canine prostate: immunohistochemical examination for secretory antigens. **The Prostate**, New York, v.11, p.163-170, 1987.

MEDEIROS JR, L. C.; LUNARDELLI, F. Avaliação ultra-sonográfica das patologias prostáticas em cães: aspectos e diagnóstico. **Nosso Clínico: Medicina Veterinária para Animais de Companhia**, São Paulo, v.36, p.22-30, 2003.

MEUNIER, F. A. et al. Dynamics of nerve terminal remodeling unveiled using SNARE-cleaving botulinum toxins: the extent and duration are dictated by the sites of SNAP-25 truncation. **Molecular and Cellular Neurosciences**, San Diego, v.22, n.4, p.454-466, 2003.

MILLER , D.J. ; WINER, M.A. ; Ax, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology Reproduction**, v.42, p.899-915, 1990

MONTECUCCO, C. et al., Botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic applications. **Molecular Medicine Today**, Cambridge, v.2, n.10, p.418-424, 1996.

MOSTACHIO, G.Q. **Estudo comparativo entre a administração de toxina botulínica “A” e a orquiectomia no tratamento da hiperplasia prostática benigna do cão**. 2008. 87f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

MURAKOSHI, M.; IKEDA, R.; FUKUI, N. The effects of chlormadinone acetate (CMA), antiandrogen, on the pituitary, testis, prostate and adrenal gland of the dog with spontaneous benign prostatic hyperplasia. **The Journal of Toxicological Sciences**, Sapporo, v.26, n.3, p.119-127, 2001.

MURAKOSHI, M. et al. Immunolocalization of androgen receptor in canine prostatic hyperplasia – effect of antiandrogen. **The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, Tokio, v.23, n.5, p.209-212, 1998.

MUZZI, L. A. L. **Próstata do cão: aspectos clínicos, radiográficos, ultrasonográficos e citológicos das afecções**. 1998. 75 f. Dissertação (Mestrado em Medicina New York, veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

NAABY- HANSEN et al. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, New York, v.56, p.771-787, 1997.

ODERGREN, T. et al. A double blind, randomized, parallel group study of investigate the dose equivalence of Dysport and Botox in the treatment of cervical dystonia. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, London, v.64, n.1, p.6-12, 1998.

OEHNINGER, S. et al. Corrective measures and pregnancy outcome in *in vitro* fertilization in patients with severe sperm morphology abnormalities. **Fertility and Sterility**. Colchester, v.50, n.2, p.283- 287, 1988.

OETTLÉ, E. E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, Colchester, v.47, p.257- 260, 1993.

OLIVEIRA, E. G. et al. Afecções da próstata em cães na região de Botucatu, Estado de São Paulo. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 7. 1996, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: UNESP, 1996, p.327.

OLSON, P. N. et al. Disorders of the canine prostate gland: pathogenesis, diagnosis, and medical therapy. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.9, n.6, p.613-623, 1987.

ORIMA, H. et al. Short-term oral treatment of canine benign prostatic hypertrophy with chlormadinone acetate. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokio, v.57, n.1, p.139-141, 1995.

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

PAPA, F. O. et al. Coloração espermática segundo Karras modificado pelo emprego do Barbatimão (*Sthyphnodendrum barbatiman*). In: CONGRESSO DE BIOLOGIA MOLECULAR, 5, 1986, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: 1986. p.86.

PARK, D. S. et al. Evaluation of short term clinical effects and presumptive mechanism of botulinum toxin type A as a treatment modality of benign prostatic hyperplasia. **Yonsei Medical Journal**, Seoul, v.47, n.5, p.706-714, 2006.

PENNEFATHER, J. N. et al. The autonomic and sensory innervation of the smooth muscle of the prostate gland: a review of pharmacological and histological studies. **Journal of Autonomic Pharmacology**, Oxford, v.20, n.4, p.193-206, 2000.

PÉREZ-PÉ et al. Seasonal difference in ram seminal plasma revealed by partition in a aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v. 760, p.113-121, 2001.

PETER, A. T.; STEINER, J. M.; ADAMS, L. G. Diagnosis and medical management of prostate disease in the dog. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, Philadelphia, v.10, n.1, p.35-42, 1995.

PHELAN, M. W. et al. Botulinum toxin urethral sphincter injection to restore bladder emptying in men and women with voiding dysfunction. **The Journal of Urology**, New York, v.165, n.4, p.1107-1110, 2001.

POULET, F. Evolution de la prostate canina en fonction de l'âge. **Annales de Médecine Vétérinaire**, Bruxelles, v.129, p.567-584, 1985.

RANOUX, D. et al. Respective potencies of Botox and Dysport: a double blind, randomized, crossover study in cervical dystonia. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, London, v.72, n.4, p.459-462, 2002.

RAVINDRANATH, N. et al. Epidermal growth factor modulates the expression of vascular endothelial growth factor in the human prostate. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v.22, n.3, p.432-443, 2001.

READ, R. A.; BRYDEN, S. Urethral bleeding as a presenting sign of benign prostatic hyperplasia in the dog: a retrospective study (1979-1993). **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v.31, n.3, p.261-267, 1995.

REINERT, M. et al Immunohistochemical localization in the stallion genital tract and topography on spermatozoa of seminal plasma protein SSP-7, a member of the spemadhesin protein family, **Andrologia**, v.29, p179-186, 1997.

REITZ, A. et al. European experience of 200 cases treated with botulinum-A toxin injections into the detrusor muscle for urinary incontinence due to neurogenic detrusor overactivity. **European Urology**, Amsterdam, v.45, n.4, p.510-515, 2004.

REVELL, S. G.; MRODE, R. A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam, v. 36, n.1, p. 77-86, 1994.

RODRIGUES, B.A.; DONÁ, A.V.; RODRIGUES, J.L.; Influencia da secreção prostática autóloga sobre a viabilidade de espermatozóides caninos no pos descongelamento. **Brazilian Journal of Veterinary of Research and Animal Science**, v.36; p.316-323, 1999

RONCOLETTA, M. et al. SDS-PAGE seminal plasma proteins patterns and its correlation with gir breed semen freezability. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, n.2, 1999.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E.S.C.; FRANCESCHINI, P.H. 14 kDa seminal plasma protein identification and its relation with bull freezability. **Theriogenology**, Los Altos, v.57, p.479, 2002.

RONCOLETTA, M. et al. Fertility associated proteins in Nelore bull sperm membranes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.91, p.77-87, 2006.

ROSALES, R.L.; BIGALKE, H.; DRESSELER, D. Pharmacology of botulinum toxin: differences between type A preparation. **European Journal of Neurology**, Oxford, v.13(S1), p2 -10, 2006

RUGGIERI, M. R. et al.,. Human prostate muscarinic receptor subtypes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v.274, n.2, p.976-982, 1995.

RUSNACK, S. R.; KAPLAN, S. A. The use of botulinum toxin in men with benign prostatic hyperplasia. **Reviews in Urology**, Mercer Island, v.7, n.4, p.234-236, 2005.

SANDERS, D. B.; MASSEY, W.; BUCKLEY, E. G. Botulinum toxin for blepharospasm: single-fiber EMG studies. **Neurology**, BELLIN, v.36, n.4, p.545-547, 1986.

SCHANTZ, E. J.; JOHNSON, E. A. Botulinum toxin: the story of its development for the treatment of human disease. **Perspectives in Biology and Medicine**, Baltimore, v.40, n.3, p.317-327, 1997.

SCHURCH, B. et al. Botulinum-A toxin for treating detrusor hyperreflexia in spinal cord injured patients: a new alternative to anticholinergic drugs? Preliminary results. **The Journal of Urology**, New York, v.164, n.3, p.692-697, 2000.

SHIMIZU, M. et al. Effect of chlormadinone acetate-pellet implantation on the volume of prostate, peripheral blood levels of sex hormones and semen quality in the dog. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokio, v.57, n.3, p.395-399, 1995.

SHURCH, B.; REITZ, A. Botox in urology: a new treatment modality without limitations? **EAU Update Series**, v.2, n.4, p.170-178, 2004.

SHONE, C. C.; TRANTER, H. S. Growth of clostridia and preparation of their neurotoxins. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, BELLIN, v.195, p.143-160, 1995.

SIMPSON, L. L. Kinetic studies on the interaction between botulinum toxin type A and the cholinergic neuromuscular junction. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v.212, n.1, p.16-21, 1980.

SIMPSON, L. L.; DASGUPTA, B. R. Botulinum neurotoxin type E: studies on mechanism of action and on structure and activity relationships. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Palo Alto, v.224, n.1, p.135-140, 1983.

SIMPSON, L. L. Molecular pharmacology of botulinum toxin and tetanus toxin. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.26, p.427-453, 1986.

SIRINARUMITR, K. et al. Effects of finasteride on size of the prostate gland and semen quality in dogs with benign prostatic hypertrophy. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Lakewood, v.218, n.8, p.1275-1280, 2001.

SMITH, C.P.; CHANCELLOR, M.B. Emerging role of botulinum toxin in the treatment of voiding dysfunction. **The Journal of Urology**, New York, v.171, n.6, p.2128, 2004.

SOUZA, F.F.; LOPES, M.D. Massa molar das proteínas do plasma seminal canino: dados preliminares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.75-77, 2002.

SOUZA, F.F. **Caracterização eletroforética das proteínas e análise bioquímica do plasma seminal canino**. 2003. 102f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

SOUZA, F. F. Hiperplasia prostática benigna. In: GOBELO, C. **Temas de reproducción de caninos y felinos por autores latinoamericanos**. Bueno Aires: Gráfica Latina, 2004. p.71-83.

SOUZA, F.F.; MARTINS, M.I.M.; FERNANDES, C.E.S., RIBOLLA, P.E.M.; LOPES, M.D. Heparin-binding proteins of canine seminal plasma. **Theriogenology**, v.66, p.1606-1609, 2006.

SOUZA, F.F.; BARRETO, C.S.; LOPES, M.D. Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis. **Theriogenology**, v.68, p.100-106, 2007.

SPOSITO, M. M. M. Toxina botulínica tipo A - propriedades farmacológicas e uso clínico. **Acta Fisiátrica**, v.11, suppl.1, p.S7-S44, 2004.

STANWELL –SMITH, R.; THOMPSON, S.G.; HAINES, A.P.; WARD, R.J.; CASHMORE, G.; STEDRONSKA, J.; HENDRY, W.F. A comparative study of zinc, cooper, cadmium, and lead levels in fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**, New York, v.40, p.670-677.

STEERS, W. D. 5 α -reductase activity in the prostate. **Urology**, New York, v.58, suppl.6a, p.17-24, 2001.

STUBBS, A.J.; RESNICK, M.I.; Protein eletrophoresis patterns of canine prostatic fluid – Effect of hormonal manipulation, **Investigative Urology**, BELLIN, New York, v.16, p.175-178,1978.

STRZEZEK, R.; JANOWSKI, T.; BARANSKI, W. Effects of finasteride on the functioning of the prostate gland and semen quality. **Medycyna Weterynaryjna**, Lublin, v.60, n.2, p.211-214, 2004.

SUDHOF, T. C. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. **Nature**, Basigdtoke, v.375, n.6533, p.645-653, 1995.

TAKEZAWA, Y. et al. Effects of a new steroidal antiandrogen, TZP-4238 (17 α -acetoxy-6-chloro-2-oxa-4, 6-pregnadiene-3, 20-dione), on spontaneously developed canine benign prostatic hyperplasia. **The Prostate**, New York, v.27, n.6, p.321-328, 1995.

TARDIF, S.; LAFOREST, J.; CORMIER, N. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. **Theriogenology**, New York, v.52, n.3, p.447-459, 1999.

THOMAS, C. A. et al. Botulinum-A toxin: an exciting new treatment option for prostatic disease. **International Journal of Clinical Practice**, Oxford, v.60, supl.151, p.33-37, 2006.

TRACHTENBERG, J.; HICKS, L. L.; WALSH, P. C. Androgen- and estrogen-receptor content in spontaneous and experimentally induced canine prostatic hyperplasia. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v.65, n.5, p.1051-1059, 1980.

TSUTSUI, T. et al. Effect of osaterone acetate administration on prostatic regression rate, peripheral blood hormone levels and semen quality in dogs with benign prostatic hypertrophy. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokio, v.63, n.4, p.453-456, 2001.

TULSIANI, D.R.P.; YOSHIIDA-KOMIYA,H.; ARAKI,Y. mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. **Biology of Reproduction**. V.57; p.487-494, 1997

TURTON, K.; CHADDOCK, J. A.; ACHARYA, K. R. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v.27, n.11, p.552-558, 2002.

VAALASTI, A.; HERVONEN, A. Autonomic innervation of the human prostate. **Investigative Urology**, Baltimore, v.17, n.4, p.293-297, 1980.

VENTURA, S.; PENNEFATHER, J. N.; MITCHELSON, F. Cholinergic innervation and function in the prostate gland. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v.94, n.1-2, p.93-112, 2002.

VERSTEGEN, J. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, New York, v. 57, n.1, p. 149-179, 2002.

WALSH, P. C. This month in investigative urology: the role of estrogen/androgen synergism in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. **The Journal of Urology**, New York, v.139, p 826, 1988.

WILSON, J. D. The pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. **The American Journal of Medicine**, New York, v.68, n.5, p.745-756, 1980.

WINTER, M. L. et al. Induction of benign prostatic hyperplasia in intact dogs by near-physiological levels of 5 α -dihydrotestosterone and 17 β -estradiol. **The Prostate**, New York, v.26, n.6, p.325-333, 1995.

WINTER, M. L.; LIEHR, J. G. Possible mechanism of induction of benign prostatic hyperplasia by estradiol and dihydrotestosterone in dogs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v.136, n.2, p.211-219, 1996.

YASUSHIRO, S. et al. Comparison of histological compositions and apoptosis in canine spontaneous benign prostatic hyperplasia treated with androgen suppressive agents chlormadinone acetate and finasteride. **The Journal of Urology**, New York, v.165, n.1, p.289-293, 2001.

ZHANG, et al. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. **International Journal of Andrology**, Oxford, v.22, n.4, p.253-, 1999.

ZHOU, L. Q. et al. Expression and purification of the light chain of botulinum neurotoxin A: a single mutation abolishes its cleavage of SNAP-25 and neurotoxicity after reconstitution with the heavy chain. **Biochemistry**, Washignton, v.34, n.46, p.15175-15181, 1995.

Apêndice

Apêndice A

Coloração de KARRAS (KA) modificado por PAPA et al. (1986)

Para a coloração de KA modificado, utilizaram-se três soluções: 1) Rosa de Bengala [3g de rosa de bengala e 1ml de formol salina (30 a 40%) e 100 ml de água destilada], com pH aproximado de 6,9. 2) Tanino [1g de casca de barbatimão (*Stryphnodendrum barbatiman*), fervida em 20ml de água destilada durante 5 minutos, filtrada ainda quente e mantida em refrigerador], com pH de 4,5. 3) Azul Vitória (3g de Azul Vitória em 100ml de álcool metílico e após três a quatro semanas em estufa a 37°C, diluição de 20ml dessa solução em 80ml de água destilada), com pH igual a 3,2.

Após a fixação, as lâminas foram imersas em três soluções de coloração na seqüência: 1) dois minutos de Rosa de Bengala, 2) um minuto em solução de Tanino, 3) trinta segundos em solução de Azul Vitória, realizando-se a lavagem das lâminas em água corrente sempre após cada imersão nas soluções. As lâminas após coloração foram secas em temperatura ambiente.

Apêndice B**Solução Hiposmótica**

Tabela 1B. Preparo da solução de frutose a 100 mOsm/kg, empregado no teste hiposmótico.

Reagente	Quantidade
Frutose (g)	0,9
Citrato Trisódico (g)	0,49
Água destilada (q.s.p.)	100 ml

Fonte: REVELL & MRODE (1994)

Apêndice C

Tabela 1C. Solução estoque e de trabalho empregadas na técnica de fluorescência para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozóides caninos. Jaboticabal – SP, 2009.

Soluções	Constituintes	Quantidade
I. Solução estoque de DIC	DIC	9,2mg
	DMSO	20ml
II. Solução estoque de IP	IP	10ml
	NaCl 0,9%	20ml
III. Solução estoque de formaldeído	Formalina a 40% Solução fisiológica	Diluição 1:80
IV. Solução estoque de citrato de sódio a 3%	Citrato de sódio	3g
	Solução fisiológica	100ml
V. Solução de trabalho	DIC	20µl
	IP	10µl
	Formaldeído	10µl
	Solução IV	960µl
Amostras para avaliação	Sêmen	10µl
	Solução de trabalho	40µl

Fonte: ZUCCARI, C.E.S.N. (1998)

Apêndice D

TABELA 1D. Metodologia utilizada para dosagem de proteínas totais, de acordo com as indicações do fabricante (LABTEST®). Jaboticabal – SP, 2009.

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-	0,02ml	-
Padrão	-	-	0,02ml
Água destilada ou deionizada	0,02ml	-	-
Reagente Biureto	1ml	1ml	1ml

TABELA 2D. Metodologia utilizada para dosagem de cloretos totais, de acordo com as indicações do fabricante (LABTEST®). Jaboticabal – SP, 2009.

	Branco	Teste	Padrão
Reagente de cor	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml
Ativador	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Amostra	-	0,01 ml	-
Padrão	-	-	0,01 ml