



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**Caracterização proteica do plasma seminal de cães submetidos à
castração química por meio de injeção intratesticular de solução a base
de gluconato de zinco.**

Lorena Tavares de Brito Nery

RECIFE

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

Caracterização proteica do plasma seminal de cães submetidos à castração química por meio de injeção intratesticular de solução a base de gluconato de zinco.

Lorena Tavares de Brito Nery

“ Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Érika Christina Santos Oliveira
Co-orientador: Arlindo de A. A. N. Moura ”

RECIFE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**Caracterização proteica do plasma seminal de cães submetidos à
castração química por meio de injeção intratesticular de solução a base
de gluconato de zinco.**

Lorena Tavares de Brito Nery

Dissertação aprovada em ____/____/____

Prof. Dr^a Érika Christina Santos Oliveira
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Orientadora

Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Avaliador

Prof. Dr^a Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Avaliador

Prof. Dr^o Valdemiro Amaro da Silva Júnior
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Avaliador

DEDICATÓRIA

À minha Avó Maria de Nazareth Tavares de Brito **in memorian*,
por ter sido o maior exemplo de caráter que tive em minha vida.

À meus cachorros, Dalila **in memorian*, Ádila, Pituca e Vaqueirinho e meus
pacientes caninos por permitirem que eu os conheça tão intimamente!

REFLEXÕES:

A questão não é: "Eles são capazes de raciocinar?" Nem tampouco seria: "Eles são capazes de falar?" A questão é: "Eles são capazes de sofrer"?

Bentham et al., 1789.

Agradecimentos

À Deus, pela força em persistir no meu caminho;

Aos meus pais, Gisela e José Carlos,

pelo exemplo de vida;

Às irmãs Carol, Duda e Lívia pelo carinho e amizade;

À minha família (Tia Kila, Aninha, Tio Salatiel, Tia Onca, Rá, Toninho, Caio, Tio Fábio, Tia Ane, Táta, Cito, Tio Márcio, Padrinho Nando, Tia Vera, Pepê, Diguinho, Tio Equinho e Rione), pelo amor incondicional;

À Laurien pelo carinho, amor, respeito e anos de sua vida dedicados a minha pessoa.

“Ao nosso amor...que seja eterno apenas enquanto durar! Mas que o respeito e admiração sejam ad eternum”. Obrigada por fazer parte da minha estória!

À professora Érika, pela disponibilidade de orientação e todos os conhecimentos passados;

Ao professor Lêucio e toda a equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRPE, pelos teste sorológicos de leishmaniose;

Ao professor Arlindo e toda a equipe do Laboratório de Fisiologia Animal da Universidade Federal do Ceará pela elaboração e análise dos mapas eletroforéticos;

À Professora Madalena Guerra e toda equipe do Laboratório de Andrologia da UFRPE pelos exames andrológicos;

À professora Marleyne pela atenção e disponibilidade durante todo o curso;

À dona Rejane e todos os meus amigos cearences pelo carinho;

À Giselle Auntie y Verônica Gonzalez, mis compañeras, por las palabras sinceras, por ayudarme a resolver algunos paradigmas.

*À Ana Paula Bandeira e toda equipe da Clínica Veterinária República dos Bichos pela
pela compreensão nos momento de ausência.*

Aos técnicos Joana e Alcir pela disponibilidade;

*Ao grupo de reprodução de pequenos animais da UFRPE: Cibele, Kaká, Rebeka,
Cecília, Thaís e Adriana... pela amizade;*

Aos tutores dos animais, pela confiança e apoio;

*A todos que contribuíram para minha formação de maneira direta ou indireta ao longo
desses anos.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Capes- pelo apoio
financeiro.*

FINANCIAMENTO

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

CnPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 CASTRACÃO QUÍMICA: UM NOVO CONCEITO DE CONTRACEPÇÃO	14
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4 ARTIGOS	20
4.1 Perfil protéico do plasma seminal de cães (cannis familiares)	20
4.2 A castração química através da injeção de gluconato de zinco é capaz de alterar a quantificação proteica do plasma seminal canino?	35
5. CONCLUSÃO	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

Resumo

Caracterização proteica do plasma seminal de cães submetidos à esterilização química por meio de injeção intratesticular de solução à base de zinco.

Esse estudo, objetivou verificar o perfil proteico do plasma seminal de cães esterilizados quimicamente. Três cães, púberes, sem raça definida, foram submetidos há duas coletas de sêmen antes (D0) e 60 dias após a castração química (D60). As amostras de sêmen foram analisadas (concentração, motilidade, vigor e volume) e centrifugadas para obtenção do plasma seminal. Em seguida, alíquotas contendo 400 µg de proteína total foram submetidas a eletroforese 2-D (18% SDS-PAGE, pH 4-7) e os géis analisados pelo Software PD Quest. A concentração, motilidade, vigor e volume do ejaculado encontravam-se dentro dos padrões fisiológicos de normalidade para a espécie canina. Foram $(220,6 \times 10^6 \pm 10,97 \text{ sptz/mL}$, 80%, 3,3 e $5 \pm 1,53 \text{ mL}$, respectivamente). Sessenta dias após a castração química todos os animais encontravam-se azoospermicos mas continuaram a ejacular o plasma seminal cujo volume foi de $3,67 \pm 2,68 \text{ mL}$. As proteínas mais abundantes do plasma seminal de cão encontram-se em torno de 12 kDa e na faixa de pH de 4.2 a 6.6. Estas proteínas correspondem a 61,68% do total proteico do plasma seminal do cão, sendo encontrados $167,3 \pm 23,6 \text{ spots}$ proteicos que não diferiram entre D0 e D60. A próstata é um órgão andrógeno-dependente e responsável pela maior parte da secreção do plasma seminal canino, sua função manteve-se inalterada no presente estudo. Oliveira et al (2012) demonstraram que a castração química não exerce influência sobre os níveis séricos de testosterona em cães. No entanto, Wang (2002) relatou que após 24 meses da injeção intratesticular de zinco a próstata apresentou uma redução de 52% do seu tamanho original. Conclui-se que 60 dias não é suficiente para promover alterações do perfil eletroforético proteico no plasma seminal de cães submetidos a castração química.

Palavras-chaves: proteômica, eletroforese, esterilização, cão, sêmen, zinco.

Abstract

Characterization of protein in seminal plasma of dogs subjected to chemical sterilization by injection of intratesticular zinc-based solution.

This study objective to investigate the profile protein of the seminal plasma in dogs chemically sterilized. Three dogs, pubescent mongrel, were submitted for two semen collections before (D0) and 60 days after chemical castration (D60). Semen samples were analyzed (concentration spermatic, motile, vigor and volume) and centrifuged to obtain seminal plasma. An aliquot containing 400 mg total protein were subjected to 2-D electrophoresis (18% SDS-PAGE, pH 4.7) gels and analyzed by the PD Quest software. The concentration spermatic, motile, viability and ejaculate volume were within normal physiological standards for dogs. Was ($220.6 \pm 10.97 \times 10^6$ sperm / mL, 80%, 3.3 ± 1.53 and 5 mL, respectively). Sixty days after chemical castration all animals were azoospermic but continued to ejaculate the seminal plasma whose volume was 3.67 ± 2.68 mL. The most abundant proteins in the seminal plasma dog are around 12 kDa and pH range from 4.2 to 6.6. These proteins corresponded to 61.68% of total seminal plasma-protein dog, being found 167.3 ± 23.6 spots protein did not differ between D0 and D60. Since the prostate is an androgen-dependent organ responsible for most of the secretion of seminal plasma canine. Oliveira et al (2012) demonstrated that chemical castration has no effect on serum testosterone levels in dogs. However, Wang (2002) reported that after 24 months of intratesticular injection of zinc prostate showed a reduction of 52% of its original size. We conclude that 60 days is not enough to promote changes in the protein electrophoretic pattern in seminal plasma of dogs subjected to chemical castration.

Keywords: proteomics, electrophoresis, sterilization, dog, semen zinc.

1 Introdução

O controle populacional de cães errantes é um problema nacional que tem atingido às grandes e pequenas cidades brasileiras. Por este motivo, os métodos de prevenção ou interrupção do ciclo reprodutivo de cães vêm sendo largamente discutidos pela comunidade científica, com o intuito de proporcionar um maior bem-estar para a espécie canina e também visando o controle das zoonoses. Por esta razão, existe uma busca incessante por técnicas menos invasivas, tais como a utilização de agentes esclerosantes no testículo ou epidídimo (FAYRER-HOSKEN, *et al.*, 2000).

Desde 2003, um agente esclerosante à base de zinco (Testoblock, BioRelease Technologies, Birmingham, AL, EUA) vem sendo estudado para ser utilizado na esterilização de machos caninos por meio de injeção intratesticular. Sua eficácia foi avaliada em animais entre oito meses e quatro anos de idade e os resultados encontrados indicam que a solução à base de zinco (Testoblock) é eficaz em bloquear a espermatogênese (OLIVEIRA, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007). No entanto, apesar da eficácia comprovada da castração química na esterilidade dos animais, ainda não se sabe quais os impactos que essa técnica causaria na transmissão de doenças sexualmente transmissíveis (DST), uma vez que os animais mantêm a libido e alguns deles continuam a ejacular apenas líquido prostático.

Já é comprovada a eficácia da castração química em cães machos, pois Oliveira *et al.* (2007) em seus trabalhos verificaram que a injeção intratesticular de gluconato de zinco promove uma atrofia nos túbulos seminíferos e uma azospermia nos cães submetidos ao tratamento. No entanto, na literatura consultada não há relato se a injeção intratesticular de gluconato de zinco exerce influência sobre o perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal de cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CASTRAÇÃO QUÍMICA: UM NOVO CONCEITO DE CONTRACEPÇÃO

Um dos maiores desafios para a saúde pública e para o bem-estar animal é encontrar formas eficazes para o controle da população canina nas grandes e pequenas cidades. Por esta razão, se observa uma busca incessante por técnicas menos invasivas e com custos monetários reduzidos a fim de viabilizar os métodos de contracepção para população canina. A castração química, ou esterilização química, é um método inovador capaz de fazer um controle efetivo da reprodução de animais de companhia, sejam eles errantes ou pertencentes às famílias de baixa renda, devido à eficácia e ao baixo custo do procedimento.

Na literatura, é possível encontrar um número considerável de trabalhos abordando a utilização de agentes esclerosantes no testículo, epidídimo e ducto deferente (PINEDA et al., 1977; NISHIMURA et al., 1992; IMMEGART e THRELFALL, 2000). As substâncias já utilizadas em machos caninos e felinos incluem: glicerol (IMMEGART e THRELFALL, 2000), tanato de zinco, gluconato de zinco (FAHIM et al., 1993), clorexidina (AIUDI et al., 2010), dimetil-sulfóxido (PINEDA et al., 1977; PINEDA e DOLEY, 1984), ácido láctico (NISHIMURA et al., 1992) e cloreto de cálcio (BARAN et al., 2010).

Devido a diversidade de produtos já utilizados com a finalidade de esterilizar um animal quimicamente, foi definido que a esterilização química, para ser considerada eficaz como a cirurgia, deveria preencher alguns requisitos. Inicialmente, a técnica deve ser eficaz em uma grande porcentagem de animais tratados. Segundo, esta deve ser segura para os animais tratados e para o meio-ambiente e, finalmente, deve ser irreversível após um único tratamento. O primeiro produto que preencheu estes requisitos foi o gluconato de zinco (OLIVEIRA et al, 2007).

Segundo Fahim et al. (1993), o gluconato de zinco é a substância mais promissora para ser utilizada como método contraceptivo químico por ser considerada uma substância não-carcinogênica, não-teratogênica e não-mutagênica. Além disso,

Oliveira et al. (2007), Levy et al. (2008) e Oliveira et al. (2012) comprovaram que a utilização do gluconato de zinco é uma alternativa eficaz na castração de cães machos.

O primeiro medicamento à base de gluconato de zinco foi o Neutersol[®] (Pet Healthcare International, Inc., Columbia, MO, USA), lançado nos EUA em 2003 e ficou indisponível no mercado entre 2005 e 2007. Em 2008 foi lançado no México com um novo nome (Esterisol[®], Ark Sciences).

Em 2009, o Infertile[®] (Rhobifarma, Hortolândia, SP, Brazil) foi lançado no Brasil. Utilizado também com a finalidade de castrar quimicamente cães machos, o Infertile[®] torna-se semelhante ao Neutesol[®]/Esterisol[®], no entanto, sua formulação difere por conter DMSO como veículo para a difusão da droga quando injetada no testículo, além disso, a concentração de zinco utilizada é duas vezes maior (SOTO et al., 2009).

Desde 2003, outro agente esclerosante à base de gluconato de zinco (Testoblock, BioRelease Technologies, Birmingham, AL, USA) começou a ser estudado para ser utilizado na esterilização de machos caninos por meio de injeção intratesticular e Oliveira et al. (2007) comprovaram em seus estudos a eficácia do medicamento em bloquear a espermatogênese. No entanto, este medicamento ainda não se encontra disponível no mercado (OLIVEIRA et al., 2010).

O Testoblock[®] é uma solução que contém 0,2M de gluconato de zinco (13.1 mg zinco/ml, seu pH foi neutralizado em arginina e um veículo fisiológico não irritante foi desenvolvido pela Biorelease Technologies LLC (Birmingham, Alabama, USA) (OLIVEIRA et al., 2010).

O zinco, componente da formulação do Testoblok[®], é um elemento químico de pH neutro que está presente na composição do plasma seminal e nos tecidos do trato reprodutor masculino. Estudos ainda revelam que o plasma e os tecidos desta região contêm uma concentração de zinco maior que qualquer outro órgão do corpo (FAHIM et al. 1993) e que parte da concentração do zinco presente no plasma seminal de cães e humanos tem origem prostática (JOHNSON et al., 1969, LINDHOLMER e GLAUMANN 1972).

O zinco também é um componente importante do sêmen e afeta a motilidade espermática (HIDIROGLOU e KNIPFEL, 1984). Ainda está envolvido no desenvolvimento testicular, espermatogênese e função espermática (HENKEL et al.,

2003). Dados revelam que cerca de 93% do zinco está localizado no flagelo de espermatozoides presentes no ejaculado (HENKEL et al., 1999), enquanto 7% do zinco restante está localizado na cabeça do espermatozoide contribuindo, dessa forma, para a estabilização da estrutura quaternária do núcleo da cromatina espermática (BJÖRNDÅHL e KVIST, 1990, KVIST et al., 1990).

Ele ainda é essencial para a reprodução, crescimento normal e expectativa de vida dos animais, auxiliando no processo de reparação tecidual e cicatrização. Por fim, é um mineral considerado não-carcinogênico, não teratogênico e não mutagênico (LEONARD et al., 1987).

Por esta razão não existe nenhum trabalho na literatura científica que levante hipóteses que o uso do Testoblock[®] causaria qualquer tipo de neoplasia testicular ou doenças prostáticas de origem andrógeno-dependente.

De fácil aplicação e baixo custo, o Testoblok[®] foi formulado para uso apenas em injeção intra-testicular (OLIVEIRA, et al., 2012). Inicialmente, os animais podem ser submetidos a uma sedação leve com Sulfato de Atropina (0,44ml/kg) e Xilazina (1.0 mg/kg), objetivando facilitar a contenção, higieniza-se a bolsa escrotal com iodo-povidine e em seguida mensura-se a lagura de cada testículo. Cada testículo receberá uma única injeção e a quantidade de Testoblock[®] que será injetada e obedecerá a metodologia proposta por Wang (2002).

Na literatura encontram-se relatos que alguns cães apresentaram desconforto após a injeção intra-testicular de medicações semelhantes ao Testoblok[®]. Estas observações foram realizadas por Soto et al. (2007) utilizando o Infertile[®] (Rhobifarma, Hortolândia, SP, Brazil), e Wang (2004, 2002) utilizando o Neutersol[®] (Pet Healthcare International, Inc., Columbia, MO, USA).

O gluconato de zinco, assim como outros agentes esclerosantes, quando injetados no parênquima testicular levam a sua atrofia e decréscimo da espermatogênese (OLIVEIRA, 2006).

Não se sabe ao certo qual o mecanismo de ação da injeção intratesticular a base de zinco. Mas, algumas linhas de pesquisa acreditam que uma ruptura da barreira de células de sertoli seria o responsável por induzir uma resposta imunológica e inflamatória, causando alterações celulares levando à interrupção da espermatogênese (OLIVEIRA et al., 2007).

A inibição da espermatogênese ocorre devido à liberação de citocinas inflamatória, espécies reativas ao oxigênio e glicocorticóides que possui efeitos deletérios sobre o epitélio seminífero (HEDGER e MEINHARDT, 2003; JANA e SAMANTA, 2011; O'BRYAN et al., 2000; REDDY et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2012).

Wang et al. (2002) avaliaram em seus estudos o efeito da injeção intratesticular de Neutersol[®] em cães com idades entre 2½ a 10 meses, e observaram aspermia, azoospermia ou necrospermia aos 60 dias do início do tratamento em 95% dos animais. Ele atribuiu o mecanismo de ação da droga ao zinco que causou atrofia dos túbulos seminíferos com formação de tecido de granulação que impediu a migração dos espermatozóides dos túbulos seminíferos para o epidídimo.

Oliveira et al (2007) observaram que áreas próximas do local da injeção tinham severas formações de tecido cicatricial e atrofia dos túbulos seminíferos. Entretanto, os túbulos retos e a *rede testis* permaneceram intactos demonstrando que não havia interrupção da passagem dos espermatozoides para o epidídimo (OLIVEIRA et al., 2007).

Oliveira et al. (2007) também relataram que o mecanismo de ação do zinco quando injetado nos testículos dos animais seria capaz de atuar na interrupção da espermatogênese de forma direta, por meio da ruptura da barreira de células de Sertoli e aumento da resposta inflamatória local. Oliveira et al. (2011) sugerem que, em consequência desta resposta inflamatória, a espermatogênese seja afetada de maneira irreversível, deixando o animal estéril. Silva et al. (2010a, b) avaliaram o efeito da injeção intratesticular de gluconato de zinco em cães nos primeiros dias subsequentes à injeção, por meio de análise histológica e ultraestrutural, e os achados encontrados por estes autores, associados aos relatados de Oliveira et al. (2007), demonstram que a injeção intratesticular de zinco possuiria uma ação mais específica sobre a espermatogênese, seja de forma direta ou por meio do desencadeamento de uma reação inflamatória local e não devido apenas à formação fibrose que impediria a passagem dos espermatozóides dos túbulos seminíferos para o epidídimo, como sugerido por Wang (2002). Acredita-se que a injeção intratesticular da solução à base de zinco desenvolve um quadro semelhante ao observado na orquite auto-imune, ou seja, um processo inflamatório testicular mediado por formação de anticorpos contra os próprios antígenos testiculares do animal (MANN e LUTWAK-MANN, 1981). Talvez esta reação

inflamatória fosse capaz de gerar algum desconforto após o procedimento. Por esta razão, Oliveira et al (2012) sugeriram a utilização de um anti-inflamatório não-esteroidal nos cães que apresentassem desconforto após a injeção intra-testicular.

Lorena et al., (2010) sugeriram que as administrações de analgésicos orais com efeitos anti-inflamatórios seriam capazes de reduzir as reações de sensibilidade, incluindo vocalização, perda de apetite e dor, após utilização do Infertile[®].

Oliveira et al., (2012), em seus estudos, avaliaram que a dipirona sódica, um anti-inflamatório não-esteroidal, não exerce influência negativa na ação do gluconato de zinco. Em seu estudo é relatado que 5 cães receberam dipirona sódica (25 mg/kg) três vezes ao dia por 2 dias, começando 2-3 horas após a injeção intratesticular de gluconato de zinco e após 60 dias todos os cães estavam azoospermicos semelhante aos que não receberam as doses diárias de dipirona sódica (25 mg/kg).

Vários autores citam que o zinco exerce ação sobre a metabolização da testosterona a Diidrotestosterona (DHT) (LEATHAM, 1970) inibindo a ação da enzima 5 α - redutase. A diminuição da DHT contribui para a diminuição do tamanho da próstata, que é um órgão andrógeno-dependente. Nos cães submetidos á castração química por meio do zinco não foi observada diminuição da concentração de testosterona em avaliação realizada aos seis meses após o procedimento (OLIVEIRA et al., 2012), entretanto, estudos mostraram diminuição em até 50% - 52% do peso da próstata 24 meses após a injeção de zinco (NEUTERSOL, 2003; WANG, 2004). Até a presente data, acredita-se que esta técnica não pode ser utilizada na prevenção de doenças prostáticas.

Assim, apesar da castração química ser um método prático e acessível para toda a sociedade, ainda é um método de caráter exclusivo para controle populacional. Pois, como os animais continuam apresentando libido e realizando cópulas, não se sabe qual o impacto desta técnica teria na transmissão de doenças venéreas. Sendo necessários estudos que comprovem a eficácia da técnica também na prevenção de doenças sexualmente transmissíveis como a brucelose e a leishmaniose.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal de cães sadios que foram submetidos à castração química por meio da injeção intratesticular de gluconato de zinco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Descrição do mapa eletroforético bidimensional do plasma seminal cães sem raça definida antes da castração química.
- 3.2.2 Descrição do mapa eletroforético bidimensional do plasma seminal de cães sem raça definida após a castração química.
- 3.2.3 Identificação de proteínas do plasma seminal de cães sem raça definida antes da castração química.

4 Artigos

4.1 Perfil protéico do plasma seminal de cães (cannis familiares)

Protein patterns of canine seminal plasma

Brito-Nery, L.T.^a, van Tilburg, M.F.^b, Menezes, E.B.^b, Machado, V. P.^b, Moura, A.A.A.^b, Oliveira, E.C.S.^a.

^a Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pernambuco 52171-900, Recife, Brasil.

^b Departamento de zootecnia, Universidade Federal do Ceará, 6002-970, Fortaleza, Brazil.

Resumo:

Nas últimas décadas, o crescente interesse pela cinofilia motivou o crescimento de uma atividade comercial lucrativa. Assim, há um interesse em aumentar a performance reprodutiva por meio de biotécnicas da reprodução como a criopreservação de gametas e inseminação artificial. Dessa forma, este trabalho objetivou descrever as proteínas do plasma seminal canino, descritas na literatura científica, assim como relacioná-las com suas respectivas funções diante da esfera reprodutiva.

Palavras-chaves: proteômica, cães, plasma seminal.

Abstract:

In the past few years, the interesting in dogs has provided an increase of this commercial activity. Thus, there is an interest in the increase of reproductive performance using biotechnology such as semen cryopreservation and artificial insemination. Seminal plasma has been found to improve the fertilizing potential of spermatozoa. The aim of this review is to describe the seminal plasma proteins in dogs and their relation to sperm fertility.

Keywords: proteomics, dogs, seminal plasma.

1. Introdução

O plasma seminal de mamíferos é uma secreção formada pelos fluidos das glândulas sexuais acessórias, epidídimos e testículos, e sua composição é capaz de afetar a função espermática desde a maturação até a fertilização do oócito no trato reprodutor feminino (Yanagimachi, 1994; Kraus et al., 2005; Foxcroft et al., 2008; Filho, 2010; Moura et al., 2011). No cão, o plasma seminal é um produto das secreções dos ductos ejaculatórios e da próstata (Johnston et al., 2001; Souza, 2007) em resposta à testosterona (Wite, 1988, Parrish e First, 1993). O ejaculado canino apresenta três frações distintas. A primeira fração, pré-espermática, é secretada em pequeno volume, com poucos ou nenhum espermatozóide e originada principalmente a partir de secreções da próstata. A segunda fração, rica em espermatozóides, é principalmente de origem epididimária e contém pouco fluido prostático. Já a terceira fração, pós-espermática, contribui com maior volume de plasma seminal durante a ejaculação e também é predominantemente de origem prostática (England et al., 1990; Rota et al., 2007; Yamashiro et al., 2009).

Acredita-se que as proteínas do plasma seminal causem efeitos benéficos sobre os parâmetros de motilidade espermática e na prevenção de formação dos peróxidos lipídicos danosos à membrana espermática. Dessa forma, este trabalho objetiva apresentar o que se tem de mais novo acerca das proteínas plasmáticas já descritas em cães.

2. Proteínas do Plasma seminal

Entre as espécies domésticas, a concentração de proteínas do plasma seminal varia entre 3 a 7% (Wite, 1988). No cão, o conteúdo médio de proteínas totais do plasma seminal é de 1,09 g/dL (Isaacs et al., 1980) a 2,19 g/dL (Souza et al., 2007). Os valores médios variam entre 1,44 g/dL, 4,25 g/dL e 3,07g/dL respectivamente, para a

primeira, segunda e terceira frações, respectivamente (England et al., 1990). Um estudo usando eletroforese unidimensional identificou 37 bandas com pesos moleculares variando entre 100,6 kDa a 3,6 kDa, e dentre estas, cerca de 85% das bandas apresentaram pesos moleculares abaixo de 17 kDa (Souza et al., 2007). A primeira e terceira fração do fluido prostático do ejaculado canino contêm proteínas de peso molecular entre 30 kDa e 75 kDa (Yamashiro et al., 2009).

No plasma seminal canino, já foram identificadas a lactoferrina, arginina esterase, proteínas ligadora de heparina, osteopontina e proteínas ligadoras de zinco. Estas estão descritas abaixo:

Lactoferrina:

A lactoferrina é uma glicoproteína, pertencente à família das transferrinas de peso molecular de aproximadamente 80 kDa e com alta afinidade ao íon Férnico Fe^{2+} (Metz-Boutique et al., 1984; Adlerova, 2008).

Esta proteína já foi encontrada em secreções de mucosas do fluido uterino, secreção vaginal, além da saliva, bile, suco pancreático, secreções intestinais, nasais e lacrimais (Baker, 1994; Masson et al., 1966; Levay e Viljoen, 1995; Lonnerdal e Iyer, 1995; Kikuchi et al., 2003; Baker e Baker, 2005; Adlerova, 2008).

Atua como antimicrobiano e regula a expressão gênica (Furmanski, 1995; Nozaki et al., 2002; Dacheux et al., 2005) no trato reprodutor masculino e sua ação ainda está associada com o aumento da fertilidade e da qualidade seminal (Kuo et al., 2000; Pearl e Roser., 2008).

Souza e colaboradores (2007), detectaram a presença de duas bandas com pesos moleculares semelhantes à lactoferrina (~72.9 and 76.6 kDa). Estudos revelam que esta proteína poderia ser considerada um marcador de função gonadal (Kikuchi et al., 2003 e

Souza et al., 2007). No entanto, não está bem descrita a expressão e a função da lactoferrina no plasma seminal canino.

Arginina esterase:

A arginina esterase (CPSE) é a proteína presente em maior quantidade no líquido prostático canino, representando mais de 90% das proteínas secretadas pela próstata do cão (Johnston et al., 2001; Gobello et al., 2002).

É produzida pelas células epiteliais secretoras da próstata sob influência da testosterona (Klausner et al., 1994), pertence à família das calicreínas e atua como um marcador biológico da próstata estando em níveis plasmáticos elevados em caninos portadores da Hiperplasia Prostática Benigna (Klausner et al., 1994) e apresenta grande semelhança com o antígeno prostático específico (PSA) humano (Dubé et al, 1986).

A CPSE possui ação enzimática e está presente em altas concentrações no fluido prostático do cão (aproximadamente 10 ng/mL) (Mcentee et al., 1987). Existem hipóteses de que esta proteína se ligaria ao espermatozóide com a finalidade de catalisar proteínas presentes na superfície espermática ou ser transportada como proteína “ligada” para atuar em sítios distantes (Dubé, 1994). Estudos anteriores sugeriram que a CPSE atuaria na cauda do espermatozóide, onde a enzima já foi detectada por imunofluorescência (Frenette et al., 1985).

Estudos anteriores sugerem que esta enzima seja capaz de hidrolisar o muco cervical da fêmea podendo estar correlacionada com motilidade das tubas uterinas e do útero, durante a fecundação e durante à clivagem do cininogênio em cinina, que é um potente fator vasoativo (Dubé et al., 1994; Souza e Toniollo, 2001).

O peso molecular médio da CPSE presente no plasma seminal é 29,5 kDa por filtração em gel (Sephadex G-100) e de 25 kDa utilizando a de eletroforese SDS-PAGE na ausência de mercaptoetanol (Chapdelaine et al., 1984). Estruturalmente é formada

por duas subunidades, H e L, com pesos moleculares variando de 15 kDa e 12 a 14 kDa, respectivamente (Isaacs e Shaper, 1985).

Souza et al. (2007) identificaram em seus estudos altas concentrações de uma banda com peso molecular de 15.6 kDa. Os autores sugeriram que seria uma subunidade da arginina esterase, além disso, esta proteína é considerada uma homóloga da família das (Proteínas Ligadoras de Heparina) HBPs do plasma seminal equíno (Calvete et al., 1995).

Proteínas Ligadoras de Heparina (HBPs):

O plasma seminal de cães contém cerca de 19 a 23 proteínas ligadoras de heparina (Souza et al., 2006; Souza et al., 2007). Sendo essas, as principais candidatas a serem marcadores de fertilidade, sendo elas: osteopontina (OPN), prostaglandina D-sintase tipo lipocalina (PDGS), BSP-30 kDa, fosfolipase A2 (PLA-2), espermedesinas, proteínas de ligação à heparina, P25b e clusterina (Jobim et al., 2009).

O espermatozóide possui a capacidade de ligar-se à heparina e às 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 do acrossomo induzida pelas glicosaminoglicanas da zona pelúcida (Miller et. al., 1990).

A capacitação espermática ocorre no trato reprodutivo feminino, que contém fluidos com altas concentrações de GAGs (Lee e Ax, 1984; Lee et al., 1986), que são secretados, particularmente, na fase folicular (Lenz et al., 1983). A heparina é uma glicosaminoglicana e estudos revelam que ela induz a capacitação em espermatozoides de touros e ratos (Nass et al., 1990).

As proteínas ligadoras de heparina (HBPs) são responsáveis por modular eventos de ligação da heparina à membrana espermática servindo como marcadores

moleculares para diferentes mecanismos de fertilização (Folhadella, 2008). São produzidas pelas glândulas sexuais acessórias (próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais) dos machos e secretadas no fluido seminal (Nass et al., 1990). Têm peso molecular entre 14 e 31 KDa (Miller et al., 1990) e já são identificadas em várias espécies como bovinos (Chandonnet et al., 1990), equínos (Frazer et al., 1996; Reinert et al., 1997), suínos (Calvete et al., 1996), búfalo (Hiron et al., 2006) e cães (Souza et al., 2006).

Estudos anteriores detectaram a presença de 37 bandas de proteínas no plasma seminal canino, sendo duas correlacionadas positivamente com os parâmetros seminais (motilidade espermática, vigor, porcentagem de espermatozóides normais e integridade de membrana) (Souza, 2003). Além disso, nove bandas teriam a capacidade de se ligar a heparina e estariam envolvidas com a reação acrossomal (Souza, 2006).

Osteopontina:

A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína de peso molecular de 55 kDa e pI 4,5. Foi identificada e isolada da matriz óssea bovina, cartilagens, útero, ovários, pele fetal, rins, cérebro, urina, bile, leite bovino (Kerr et al., 1991; Sorensen e Petersen, 1993; Eloy e Furtado, 2008) e plasma seminal (Franzen e Heinegard, 1985; Eloy e Furtado, 2008).

A OPN possui na sua estrutura uma sequência de aminoácidos denominada RGD (arginina, glicina, aspartato) conservada, com capacidade de ligação a integrinas (Butler, 1995; Gonçalves et al., 2007; Moura et al., 2011), sítio de ligação para a OPN nos espermatozóides (Gonçalves et al., 2007; Moura et al., 2011). A OPN participa do processo de fertilização (Moura, 2005; Moura et al., 2011). Durante a ejaculação, a OPN proveniente do fluido das glândulas sexuais acessórias liga-se à membrana espermática através das integrinas, constituindo o complexo OPN-integrinas e interage

com receptores na membrana oocitária (D’Cruz, 1996; Moura et al., 2011), além disso a OPN parece desencadear cascatas de sinalização intracelulares que favorecem o desenvolvimento embrionário, o que explica em parte, sua associação aos índices de fertilidade dos reprodutores (Moura et al., 2011).

Em cães, estudos sobre a expressão e função da OPN são escassos. Souza et al. (2009) observaram interações de bandas com o anticorpo anti-osteopontina, sendo 2 bandas protéicas (77,2 kDa e 15,6 kDa) marcadas no “western blot” quando submetidas a eletroforese unidimensional. Na membrana espermática foram marcadas 12 bandas (70,6 kDa a 26,6 kDa), sendo 3 marcadas fortemente (46,4 kDa, 37,7 kDa e 36,5 kDa) (Souza et al., 2009). Neste estudo, os autores citaram que a presença de várias proteínas que interagiram com o anti-OPN sugeriria a presença de diferentes isoformas no plasma seminal e nas membranas espermáticas, que poderiam ter diferentes funções.

Proteínas ligadoras de zinco (ZnBps):

O zinco está envolvido tanto na espermatogênese quanto na função espermática (Henkel et al., 2003), estimando-se que apenas 7% do zinco está situado na cabeça do espermatozóide contribuindo para a estabilidade da estrutura quaternária de sua cromatina nuclear e cerca 93% do zinco encontra-se no flagelo dos espermatozoides ejaculados (Henkel et al., 1999).

Como a maior parte das secreções de plasma seminal canino são derivadas da glândula prostática (Dube et al., 1985; Nothling et al., 1993), estima-se que a maior parte das proteínas que possuem a capacidade de se ligar ao zinco sejam originadas principalmente na próstata. (Strzeżek et al., 1987; Hołody e Strzeżek, 1999; Mogielnicka-Brzozowska et al., 2011).

As proteínas transportadoras de zinco no plasma seminal (ZnBPs) são proteínas que possuem a capacidade de se ligar ao zinco para atuarem em sítios distantes. São

originadas em diferentes glândulas acessórias sexuais e elas são pontos-chaves para eventos associados ao processo de fertilização (Mogielnicka-Brzozowska, et al., 2012).

Ainda são escassos na literatura trabalhos que relacionem a função do zinco no plasma seminal canino (Mogielnicka-Brzozowska, 2012). Estudos sobre as ZnBPs em SDS-PAGE revelaram 13 bandas proteicas, cujos pesos moleculares variavam de 11.6-152.3 kDa. Além disso, foram detectadas duas frações proteicas com peso molecular de 11.6-14.3 kDa, compondo aproximadamente 28-30% do total de proteínas presente nas amostras analisadas. Os autores ainda citam que estes resultados são significativos no que conferem a capacidade do zinco em se ligar as proteínas secretadas pela próstata canina e que poderiam exercer influências no processo reprodutivo em cães.

3. Considerações Finais:

Dessa forma, ainda são escassos estudos que enfatizem as funções biológicas das proteínas presentes no plasma seminal de cães. Estes estudos possibilitarão a aplicabilidade de novas técnicas reprodutivas e um melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos da reprodução de canídeos domésticos e silvestres, contribuindo desta forma para a preservação de espécies nativas da fauna brasileira.

4. Referências Bibliográficas:

Adlerova L, Bartoskova A. Lactoferrin: a review. *Veterinari Medicina* v. 53, p. 457–468, 2008.

Baker EN. Structure and reactivity of transferrins. *Advances in Inorganic Chemistry* v. 41, p.389–463, 1994.

Baker EN, Baker HM. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cellular and Molecular Life Sciences* v. 62, p.2531–2539, 2005.

Barsanti JA, Finco DR. Moléstias Prostáticas do cão. In: ETTINGER, S.J. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 3.ed. São Paulo: Manole. V.4, 1941-63p, 1992.

Blanc P, Wong H, Bernstein MS. An experimental human model of metal fume fever. *Ann Intern Med*, v.114, p.930-936, 1991.

Brito LT, Oliveira ECS. Avaliação de um nutracêutico na eficiência reprodutiva de cães machos. *Medvop - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação* v. 9, n. 31, p. 1-637, 2001.

Butler WT. Structural and functional domains of osteopontin. *Annals of the New York Academy Sciences*, v. 760, p. 6-11, 1995.

Calvete J, Sanz L, Reinert M, Dostalova Z, Topfer-Petersen E. Heparin-binding proteins on bull, boar, stallion, and human spermatozoa. *Mem Mus Nat Hist Nat*, v. 166, p. 515–24, 1995 [abstract].

Calvete JJ, Carrera E, Sanz L, Töpfer-Petersen E. Boar spermadhesins AQN-1 and AQN-3: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. *Biology Chemistry*, v. 377, p. 521-527, 1996.

Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, et al. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Molecular Reproduction Development*, v. 26, p.313–8, 1990.

Chapdelaine P, Dube JY, Frenette G, Tremblay RR. Identification of arginine esterase as the major androgen-dependent protein secreted by dog prostate and preliminary molecular characterization in seminal plasma. *Journal Andrology*, v. 5, p. 206-210, 1984.

Chapdelaine P, Ho-Kin MA, Tremblay RR, Dubé JY. Nucleotide sequence of the androgen-dependent arginine esterase mRNA of canine prostate. *Febs Letters*, v. 232, n. 1, p.187-192, 1988.

Dacheux J, Castella S, Gatti JL, Dacheux F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*, v. 63, p. 319–341, 2005.

Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J*, v. 7, p. 1475–1482, 1993.

D’cruz OJ. Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: relevance to infertility. *Frontiers in Bioscience*, v. 1, p. 61-176, 1996.

Dube JY, Frenette, G.; Chapdelaine P, Paquin R, Tremblay RR. Biochemical characteristics of the proteins secreted by dog prostate, a review. *Experimental Biology* v. 43, p. 149-159, 1985.

Dubé JY, Lazure C, Tremblay RR. Dog prostate arginine esterase is related to human prostate specific antigen. *Clinical Investigative Medicine*, v. 9, p. 51–54, 1986.

Dubé JY. Prostatic kallikreins: biochemistry and physiology. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 107, p. 13–20, 1994.

Eloy ÂMX, Furtado JR. Marcadores de Congelabilidade no Plasma Seminal de Caprinos - Estudos Preliminares. Disponível em <http://www.cnpc.embrapa.br>. Acesso em Janeiro de 2013.

England GCW, Allen WA, Middleton DJ. An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. *Research in Veterinary Science.*, v. 49, p. 66-70, 1990.

Erikson DW, Way AL, Chapman DA, Killian GJ. Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. *Reproduction*, v. 133, p. 909–917, 2007.

Franzen A, Heinegard, D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bovine calcified matrix. *Biochemical Journal*, 232:715-724, 1985

Frazer GS, Bucci DM. Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, v. 46, p. 1389–402, 1996

Frenette G, Dube JY, Marcotte JR, Tremblay RR. Arginine esterase from isolated dog prostate secretory granules is fully active enzymatically. *Canadian Journal Physiology and Pharmacology*, v.63, p. 1603-1607, 1985.

Furmanski PHJ. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature* v. 23, p. 721-724, 1995.

Gobello C, Castex G, Corrada Y. Serum and seminal markers in the diagnosis of disorders of the genital tract of the dog: a mini-review. *Theriogenology*, v. 57, n. 4, p. 1285-1291, 2002.

Gonçalves RF, Staros AL.; Killian GJ. Oviductal fluid proteins associated with the bovine zona pellucida and the effect on in vitro sperm-egg binding, fertilization and embryo 582 development. *Reproduction Domestic Animal*, v. 43, p. 720-729, 2008.

Hiron M, Harshan LP, Singh A, Arangasamy MR. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 93, p. 124-133, 2006.

Isaacs JT, Isaacs WB, Coffey D.S. Differential effects of estrogens treatment on canine seminal plasma components. *Investigative Urology*, v. 17, p. 495-498, 1980

Isaacs JT, Coffey DS. Changes in dihydrotestosterone metabolism associated with the development of canine benign prostatic hyperplasia. *Endocrinology, Chevy Chase*, v. 108, n. 2, p. 445-453, 1981

Jobim MIM, Gregory RM, Mattos RC. Marcadores protéicos de fertilidade no plasma seminal e na membrana plasmática. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 6 ,p. 11-19, 2009.

Johnston SD, Root K, Olson PNS. Breeding management and artificial insemination of the bitch. In: Canine and feline theriogenology. Philadelphia: WB Saunders, p.41-65, 2001.

Kerr JM, Fisher LW, Termine JD. The cDNA clone and distribution of bovine osteopontin. *Gene*, 108:237-243, 1991.

Kikuchi M, Mizoroki S, Kubo T, Ohiwa Y, Kubota M, Yamada N, Orino K, Ohnami Y, Watanabe K. Seminal plasma lactoferrin but not transferrin reflects gonadal function in dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 65, p. 679–684, 2003.

Klausner JS, Bell FW, Hayden DW, Johnston SD, Lund EM. Recent developments in the diagnosis and treatment of BPH and prostatic carcinoma. *Proceedings American College of Veterinary Internal Medicine*, p.547-8, 1994.

Kuo YH, Cheng WTK, Tu CF, Wu SC, Chen HT, Hsieh SH. Motility and fertility of frozen semen from normal and transgenic boars with or without transgene. *Ajas, Asian-Aust J Anim Sci* 13(Suppl vol A):74, 2000.

Levay PF, Viljoen M. Lactoferrin: a general review. *Haematologica*, v. 80, p. 252–267, 1995.

Lenz RW, Ball GD, Loohe JK, First NL, Ax RL. Chondroitin sulfate facilitates an acrossome reaction in bovine spermatozoa. *Biology Reproduction*, 28:683-685, 1983.

Lonnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function *Annual Review of Nutrition*, v. 15, p. 93–110, 1995.

Martins MIM, Souza FF, Lopes MD. Eletroforese das proteínas do fluido epididimal canino: Dados preliminares. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 26, n. 2, p. 72-75, 2002.

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

Masson PL, Heremans JF, Dive C. An iron-binding protein common to many external secretions. *Clinica Chimica Acta*, v. 14, p. 735–739, 1966.

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.

Metz-Boutique MH, Jolles J, Mazurier J, Schoentgen F, Legrand D, Spik G, Montreuil J, Jolles P. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *European Journal of Biochemistry* v. 145, p. 659–676, 1984.

Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biology Reproduction*, v. 42, p. 899–915, 1990.

Mogielnicka-Brzozowska M, Fraser L, Czarzasta J, Kordan W. Isolation and characterization of zinc-binding proteins of canine seminal plasma *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 15, n. 3, p. 493-498, 2012.

Moura, A.A. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: the case for osteopontin. *Animal Reproduction*, v. 2, p. 3-10, 2005.

Moura AA, Andrade CR, Souza CEA, Rêgo JPA, Martins JAM, Oliveira RV, Menezes EBS. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. *Revista Brasileira de Reprod Animal*, v. 35, n. 2, p. 139-144, 2011.

Nozaki A, Tanaka K, Naganuma A, Kato N. Recent advances of basic research and clinical application of lactoferrin as an antiviral reagent against chronic hepatitis C. *Nippon Rinsho*, v. 60, p. 819-829, 2002.

Parrish JJ, First NL. Fertilization. In: **King GJ, Neimann-Sorensen A, Tribe DE.** World animal science—Reproduction in domesticated animals. New York: Elsevier, 1993. p.195-227.

Pearl CA, Roser JF. (2008) Expression of lactoferrin in the boar epididymis: Effects of reduced estrogen. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 34, p. 153–159, 2008.

Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biology*, v. 7, p. 1-10, 2006.

Reinert M, Calvete J, Sanz L, Topfer-Petersen E. Immunohistochemical localization in the stallion genital tract, an topography on spermatozoa of seminal plasma protein SSP-7, a member of the spermadhesin protein family. *Andrologia*, v. 29, p. 179–86, 1997.

Rota A, Milani C, Romagnoli S. Effect of post-thaw dilution with autologous prostaticfluid on dog semen motility and sperm acrosome status. *Theriogenology*, v. 67, p. 520-525, 2007.

Sorensen ES, Petersen TE. Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk. *Journal of Dairy Research*, v. 60, p. 198-197, 1993.

Souza FF, Toniollo GH. (2001) Marcadores de tecido prostático no cão. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP*, v. 4, n. 3, p. 63-70, 2001.

Souza FF. Caracterização eletroforética do perfil proteico e análise bioquímica do plasma seminal canino. Tese. Botucatu, Brazil: faculdade de Medicina Veterinária e Ciência Animal, UNESP; 2003. 98 pp.

Souza FF, Martins MI, Fernandes SCE, Ribolla PE, Lopes MD. Heparin-binding proteins of canine seminal plasma. *Theriogenology*, v. 66, p. 1606-1609, 2006

Souza FF. Proteínas do sêmen do cão são importantes ou não na fertilização? *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, n. 1, p. 108-114, 2007.

Souza FF, Barreto CS, Lopes MD. Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis. *Theriogenology*, v. 68, p. 100-106, 2007.

Souza FF, Chirinéa VH, Martins MIM, Lopes MD. Osteopontin in Seminal Plasma and Sperm Membrane of Dogs. *Reproduction Domestic Animal*, v. 44, n. 2, p. 283–286, 2009.

Yamashiro H, Narita K, Sugimura S, Sugawara A, Hoshino Y, Sakurai M, Yokoo M, Konno T, Yoshida M, Sato E. Influence of the Prostatic Fluid from the First and Third Fractions of the Ejaculates on the Cryosurvival of Poodle Dog Sperm. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, v. 4, n. 1, p. 14-20, 2009.

4.2 A castração química através da injeção de gluconato de zinco é capaz de alterar a quantificação proteica do plasma seminal canino?

The chemical castration through the injection of zinc gluconate is able to change the proteinous quantification of canine seminal plasma? ²

Brito-Nery, L.T.^a, van Tilburg, M.F.^b, Teixeira, T.V.D.^b, Menezes, E.B.^b, Alves, L.C.^a, Moura, A.A.A.^b, Oliveira, E.C.S.^a.

^a Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco 52171-900 Recife, Brazil.

^b Department of Animal Science, Federal University of Ceará, 6002-970, Fortaleza, Brazil.

Resumo

Esse estudo, objetivou verificar o perfil proteico do plasma seminal de cães esterilizados quimicamente. Três cães, púberes, sem raça definida, foram submetidos há duas coletas de sêmen antes (D0) e 60 dias após a castração química (D60). As amostras de sêmen foram analisadas (concentração, motilidade, vigor e volume) e centrifugadas para obtenção do plasma seminal. Em seguida, alíquotas contendo 400 µg de proteína total foram submetidas a eletroforese 2-D (18% SDS-PAGE, pH 4-7) e os géis analisados pelo Software PD Quest. As proteínas mais abundantes do plasma seminal de cão encontram-se em torno de 12 kDa e na faixa de pH de 4.2 a 6.6. Estas proteínas correspondem a 61,68% do total proteico do plasma seminal do cão, sendo encontrados $167,3 \pm 23,6$ spots proteicos que não diferiram entre D0 e D60. Conclui-se que 60 dias não é suficiente para promover alterações do perfil eletroforético proteico no plasma seminal de cães submetidos a castração química.

1. Introdução

A castração química, ou esterilização química, é um método inovador capaz de promover um controle efetivo da reprodução de animais de companhia, sejam eles errantes ou pertencentes às famílias de baixa renda, devido à eficácia e ao baixo custo do procedimento.

Segundo Fahim et al. (1993), o gluconato de zinco é a substância mais promissora para ser utilizada como método contraceptivo químico por ser considerada

uma substância não-carcinogênica, não-teratogênica e não-mutagênica. Além disso, Oliveira et al. (2007), Levy et al. (2008) e Oliveira et al. (2012) em seus trabalhos verificaram que a injeção intratesticular de gluconato de zinco promove uma atrofia nos túbulos seminíferos e uma azoospermia nos cães submetidos ao tratamento. No entanto, o tratamento não modifica o comportamento dos cães e os mesmos continuam a apresentar libido e, ainda, alguns dos animais azoospermicos continuam a eliminar plasma seminal (OLIVEIRA et al., 2012).

O plasma seminal de mamíferos é uma secreção formada pelos fluidos das glândulas sexuais acessórias, epidídimos e testículos, e sua composição é capaz de afetar a função espermática desde a maturação até a fertilização do oócito no trato reprodutor feminino (YANAGIMACHI, 1994; KRAUS et al., 2005; FOXCROFT et al., 2008; MOURA et al, 2011). No cão, o plasma seminal é um produto das secreções dos ductos ejaculatórios e da próstata (JOHNSTON et al., 2001; SOUZA, 2007) em resposta à testosterona (WITE, 1988, PARRISH e FIRST, 1993).

Oliveira et al. (2012) observaram que a castração química de cães utilizando a injeção intratesticular de gluconato de zinco não afetou a produção de testosterona em avaliação realizada um ano após o tratamento. Wang (2002), por sua vez, relatou que o peso da glândula prostática de cães diminuiu aproximadamente 50% apenas dois anos após a castração química com o gluconato de zinco. Não existem relatos na literatura acerca dos efeitos da castração química de em cães por meio da injeção intratesticular de gluconato de zinco sobre as propriedades do plasma seminal.

Dessa forma, este trabalho objetiva avaliar se a injeção intratesticular de gluconato de zinco exerce algum efeito sobre o perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal de cães.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Animais de Experimentação da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Protocolo nº 045/2012; 015832/2011-D13). Foram utilizados 3 cães, machos, sem raça definida, com idade variando entre 10 meses e 6 anos peso entre 8,5 a 10,9kg oriundos de canis particulares. Apenas cães

saudáveis, com diâmetro testicular entre 10 e 27mm e com ejaculado com motilidade progressiva $\geq 70\%$, vigor ≥ 3 e concentração espermática $> 200 \times 10^6$ espermatozoides/ml foram selecionados para o experimento. Os animais foram estimulados por meio de um swab impregnado com secreção vaginal de fêmea em estro e o sêmen foi colhido por meio da manipulação digital do pênis, tomando-se a precaução de separar as frações seminais. As colheitas foram realizadas um dia antes (D0), 60 e 150 dias após a esterilização química.

Na avaliação macroscópica foram observados volume (mL), cor e odor; e as análises microscópicas envolveram a avaliação da motilidade (0-100%), vigor (0-5) por meio da microscopia de luz (400x) e concentração espermática ($\times 10^6$) por meio da utilização da câmara de Neubauer. As avaliações seminais foram realizadas no Laboratório de Andrologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Após as análises seminais, o ejaculado foi centrifugado (800xg) durante 10 minutos e em seguida, centrifugado novamente (10000xg) para separação do plasma seminal. As amostras foram armazenadas a uma temperatura de -80°C para posterior avaliação do perfil proteico do plasma seminal.

2.2. Injeção intratesticular de gluconato de zinco

Inicialmente os animais foram pesados e submetidos a uma sedação leve com utilização de sulfato de atropina (0,044 mg/kg, SC; Atropina-Hypofarma, Ribeirão das Neves, MG, Brazil) e xilazina (1,0 mg/kg, IM; Rompun 2%, Bayer S.A., São Paulo, SP, Brazil). As doses da solução à base de zinco foram administradas segundo o diâmetro testicular do animal (Wang, 2002; OLIVEIRA, et al., 2012). Uma única injeção foi realizada na região dorso-cranial de cada testículo, ao lado da cabeça do epidídimo (o mais próximo possível do ducto eferente e rede testicular) e a agulha foi inserida num plano paralelo em relação ao testículo (WANG, 2002; OLIVEIRA, et al., 2012).

2.3. Eletroforese de segunda dimensão e análise computadorizada de mapas

A concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Aproximadamente, 400 μg de proteínas foram adicionadas a solução de hidratação (Uréia 7M, Tiouréia 2M, Ditiotreitól (DTT) 65 mM, anfólitos livres 0,5% (IPG buffer, 4-7), CHAPS 1 % e azul de bromofenol) suficiente para 250 μl e aplicadas na bandeja de hidratação (Immobilized DryStrip Reswelling Tray) e incubadas com tiras de

pH imobilizado (13 cm, com faixa de pH linear de 4 a 7; GE Healthcare, USA) por um período de 13 horas, em temperatura ambiente.

A primeira dimensão foi realizada no ETTAN™ IPGphor 3™ (GE Lifesciences, USA), seguindo o seguinte protocolo: 250V (03:00h); 500V (01:00); 800V (01:00); 1000V (01:00); 8000V (9000vh); 8000V (24000 vh), totalizando 36050 Vhs por 11 horas a 20 °C. Em seguida as tiras IPG foram equilibradas em solução tampão (6 M urea, 75 mM Tris-HCl, 29.3% glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue, pH 8.8) acrescido de DTT (AMRESCO®) sob leve agitação. Na segunda etapa do equilíbrio, as tiras (Immobiline™ DryStrip) foram mergulhadas na mesma solução de equilíbrio desta vez acrescida de iodo-cetamida e submetida a uma nova agitação.

Após a etapa de equilíbrio, as tiras foram dispostas sobre as placas com gel de poliacrilamida (18 %) utilizando um sistema do tipo DALT SIX (GE Healthcare, USA). Após a 2-D eletroforese, os géis foram fixados em uma solução com 2% ácido fosfórico; 30% etanol (3 x 20 minutos), seguidos por lavagem (3 x 20 minutos) em solução aquosa com 2% ácido fosfórico e sinalizando em solução de 2% ácido fosfórico; 15% sulfato de amônia; 18% etanol por 20 minutos e adicionado 2% Coomassie coloidal (G-250). Os géis ficaram submersos nesta solução por 4 dias, em seguida foram lavados em água destilada e escaneados com auxílio da Image Scanner III (GE Healthcare, USA) e do programa LabScan. Sendo posteriormente armazenados em solução de ácido acético à 4%. As imagens foram editadas e analisadas através do software PDQuest, versão 8.0 (Bio Rad, USA).

3. Resultados

A concentração espermática, motilidade espermática, vigor e volume foram ($220,6 \times 10^6 \pm 10,97$ spz/mL, 80%, 3,3 e $5 \pm 1,53$ mL, respectivamente). Aos 60 dias após a injeção de gluconato de zinco, os cães encontravam-se azoospermicos (Tab. 1), entretanto, continuaram a ejetar o plasma seminal, cujo volume foi de $3,67 \pm 2,68$ mL. O plasma seminal estava limpo, com odor *suis generis* e composto de apenas uma fração espermática. A libido e comportamento de macho não foram afetados. Inicialmente, a concentração proteica (CP) do plasma seminal foi de $3,54 \pm 1,76$ g/dL. Aos 60 dias a CP manteve-se inalterada. As proteínas de maiores pesos moleculares (61,68%) possuíam 12 kDa e pH 4.2-6.6 (Fig. 1). O perfil eletroforético foi de $167,3 \pm$

23,6 *spots* não sendo observada diferença entre o D0 e o D60. Dos 167 *spots* quantificados, 16 foram identificados e corresponderam a arginina esterase.

Tabela 1: Espermogramas de acordo com o período de avaliação (0, 60, 150 dias).

Animais	Peso (Kg)	Período de Avaliação (Dias)					
		0		60		150	
		VOLUME (ml)	Vigor	Motilidade Espermática (%)	Concentração espermática (x106)	VOLUME (ml)	VOLUME (ml)
1	10,9	7	4	85	240	1,5	11
2	9,7	6	2	70	202	9	12
3	8,5	2	4	85	220	0,5	2
MÉDIA	9,7	5	3,33	80	220,67	3,67	8,33
DESVIO-PADRÃO	1,2	2,65	1,15	8,66	19,01	4,65	5,51
ERRO-PADRÃO	0,69	1,53	0,67	5	10,97	2,68	0,18

Table 2: Concentração proteica do plasma seminal (g/dL) e densidade óptica (D.0) de acordo com o período de avaliação (0, 60, 150 dias).

Animais	Período de avaliação (Dias)					
	0		60		150	
	D.O.	[g/dl]	D.O.	[g/dl]	D.O.	[g/dl]
1	0,58	1,92	0,79	4,19	0,30	4,52
2	1,05	7,04	0,92	5,79	0,48	7,61
3	0,56	1,67	0,32	0,75	0,59	9,30
Média	0,73	3,54	0,68	3,58	0,46	7,14
Desvio-Padrão	0,28	3,03	0,32	2,57	0,14	2,42
ERRO-Padrão	0,16	1,75	0,18	1,49	0,08	1,40

4. Discussão

Este trabalho teve como objetivo descrever, de forma inédita, o perfil eletroforético SDS-2D das proteínas do plasma seminal canino antes e após a injeção intratesticular de gluconato de zinco (Testoblock[®]).

Estudos revelam que o plasma e os tecidos desta região contêm uma concentração de zinco maior que qualquer outro órgão do corpo (FAHIM et al. 1993) e que parte da concentração do zinco presente no plasma seminal de cães tem origem prostática, única glândula anexa presente nos cães (JOHNSON et al., 1969, LINDHOLMER e GLAUMANN 1972).

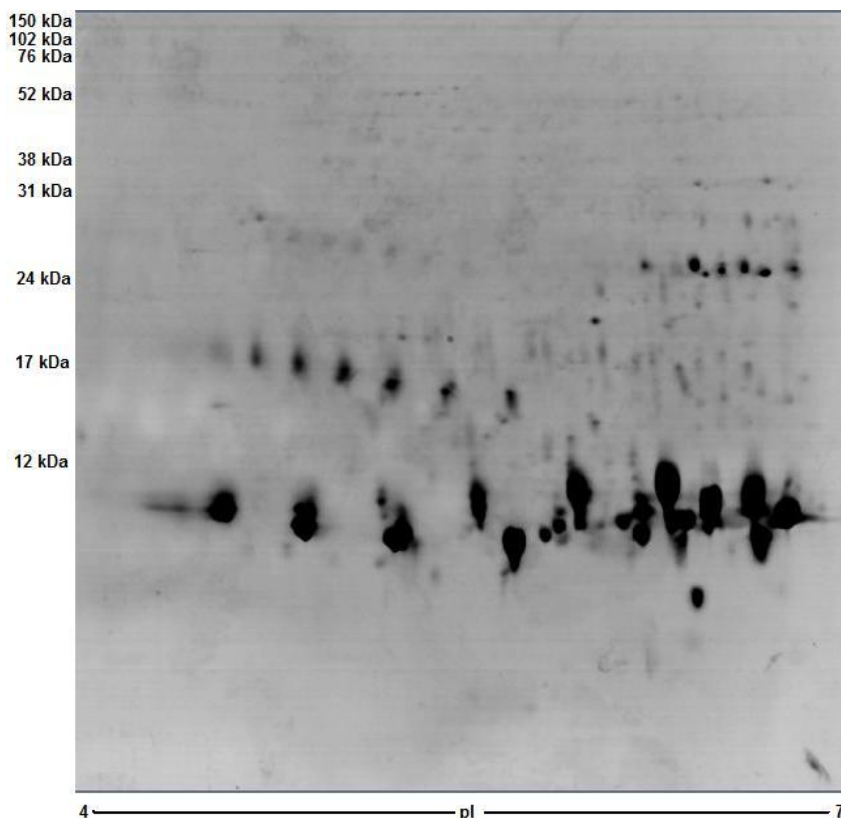


Figura 1. Mapa bidimensional do plasma seminal de cães, Sem raça definida, adultos. A figura 1 corresponde à imagem do gel master ou de referência gerado pelo software Pd Quest (Bio Rad, USA).

Vários autores citam que o zinco exerce ação sobre a metabolização da testosterona a diidrotestosterona (DHT) inibindo a ação da enzima 5α -redutase (LEATHAM, 1970). A diminuição da DHT contribui para a diminuição do tamanho da próstata, que é um órgão andrógeno-dependente. Nos cães submetidos à castração química por meio do gluconato zinco não foi observada diminuição dos níveis séricos da concentração de testosterona em avaliação realizada aos seis meses após o procedimento (OLIVEIRA et al., 2012), entretanto, estudos mostraram diminuição em até 50% - 52% do peso da próstata 24 meses após a injeção de zinco (NEUTERSOL, 2003; WANG, 2004).

Aos sessenta dias pós-castração química, todos os animais encontravam-se azoospermicos porém continuaram a eliminar o plasma seminal até o final do experimento. A libido dos animais não foi alterada, ou seja, todos os animais

apresentaram ereção e ejacularam quando estimulados. Esses dados corroboram com estudos anteriores de Oliveira et al., (2012).

Além disso, no mesmo estudo, os autores observaram que os animais continuaram a eliminar o plasma seminal com ausência de espermatozóides e presença apenas de debris celulares. No presente estudo, foi possível obter plasma seminal de todos os cães aos 60 e 150 dias após a castração química. Este achado justifica-se pelo fato da castração química exercer alteração no tamanho da próstata, única glândula acessória presente no sistema reprodutor do cão e responsável pela produção do plasma seminal apenas 24 meses após a injeção de zinco (NEUTERSOL, 2003; WANG, 2004). Entre as espécies domésticas, a concentração de proteínas do plasma seminal varia entre 3 a 7% (WITE, 1988). No cão, o conteúdo médio de proteínas totais do plasma seminal varia de 1,09 g/dL (ISAACS et al., 1980) a 2,19 g/dL (SOUZA et al., 2007).

No entanto, no presente estudo a concentração média de proteína antes da castração foi de $3,54 \pm 1,75$ g/dL divergindo da literatura consultada. Após 150 dias, esta concentração dobrou para $7,14 \pm 1,4$ g/dL. Este achado foi atribuído a ausência de espermatozóides que se ligariam a proteínas plasmáticas.

Resultados semelhantes foram encontrados por Souza et al. (2006), ao compararem a concentração total de proteínas de cães submetidos a vasectomia e cães não vasectomizados. Neste estudo, os autores avaliaram 20 machos no antes e 15 dias após o procedimento cirúrgico e foi atribuído este resultado ao fato de que, no grupo vasectomizado, como os espermatozóides estavam ausentes já aos quinze dias após a cirurgia, logo as proteínas plasmáticas estavam livres para serem quantificadas.

Dos 167 spots quantificados, 16 foram identificados e corresponderam a arginina esterase. Esses dados corroboram com a literatura, quando citam que a arginina esterase é a proteína presente em maior quantidade no líquido prostático canino, representando mais de 90% das proteínas secretadas pela próstata do cão (Johnston et al., 2001; Gobello et al., 2002).

Estudos anteriores sugerem que esta enzima seja capaz de hidrolisar o muco cervical da fêmea podendo estar correlacionada com motilidade das tubas uterinas e do útero, durante a fecundação e durante à clivagem do cininogênio em cinina, que é um potente fator vasoativo (Dubé et al., 1994; e Toniollo, 2001).

5. Considerações finais:

Dessa forma, o conhecimento do perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal canino antes e após a injeção intratesticular de zinco (Testoblock[®]) contribui com uma melhor compreensão acerca do regulação e quais os papéis dessas proteínas no plasma seminal canino.

Referências

Bredford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

Dubé JY. Prostatic kallikreins: biochemistry and physiology. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 107, p. 13–20, 1994.

Fahim MS, Wang M, Sutcu MF, Sutcu MF, Fahim Z, Younquist RS. Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. *Contraception*, v. 47, n. 1, p. 107-22, 1993.

Foxcroft et al. Identifying uneable semen. *Theriogenology*, V.70, p.1324-1336, 2008.

Isaacs JT, Isaacs WB, Coffey D.S. Differential effects of estrogens treatment on canine seminal plasma components. *Investigative Urology*, v. 17, p. 495-498, 1980.

Gobello C, Castex G, Corrada Y. Serum and seminal markers in the diagnosis of disorders of the genital tract of the dog: a mini-review. *Theriogenology*, v. 57, n. 4, p. 1285-1291, 2002.

Johnson L, Wikstrom S, Nylander G. The vehicle for zinc in the prostatic secretion of dogs. *Scandinavian Journal Urology Nephrology* v. 3, p. 9-11, 1969.

Johnston SD, Root K, Olson PNS. Breeding management and artificial insemination of the bitch. In: *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders, p.41-65, 2001.

Kraus M, Tichá M, Zelezná B. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. *Journal Reproduction Immunology*, v. 65, p. 33-46, 2005.

Levy JK, Miller LA, Crawford PC, et al. GnRH immunocontraception of male cats *Theriogenology*, v.62, p. 1116-1130, 2004.

Levy JK, Crawford PC, Appel LD, Clifford EL. Comparison of intratesticular injection of zinc gluconate versus surgical castration to sterilize male dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v. 69, n. 1, 2008.

Lindholmer C, Glauman H. Zinc and magnesium in human male reproductive tract. *Andrologie* v. 4, p. 231-237, 1972.

Moura AA, Andrade CR, Souza CEA, Rêgo JPA, Martins JAM, Oliveira RV, Menezes, EBS. Proteínas do plasma seminal, funções esperáticas e marcadores moleculares da fertilidade. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, n.2, p. 139-144, 2001.

Neutersol. Dose Determination Study. Freedom Information Summary. NADA, p. 141-217. United States Food and Drug Administration, 2003.

Oliveira ECS, Moura MR, Silva Júnior VA, Peixoto CA, Saraiva KLA, Sá MJC, Douglas RH, Marques Júnior AP. Intratesticular injection of a zinc-based solution as a contraceptive for dogs *Theriogenology*, v. 68, p.137–145, 2007.

Oliveira ECS, Muller PM, Silva FLM, Nery LTB, Sá MJC, Guerra MMP, Esquerre KPO, Kastelic JP, Douglas RH. Oral administration of an anti-inflammatory does not compromise the efficacy of intra-testicular injection of zinc gluconate as a contraceptive for dogs. *Animal Reproduction Science*, v. 132, p.207 – 212, 2012.

Parrish JJ, First NL. (1993). Fertilization. In: KING, G.J.; NEIMANN-SORENSEN, A.; TRIBE, D.E. *World animal science—Reproduction in domesticated animals*. New York: Elsevier, 1993. p.195-227.

Souza FF, Toniollo GH. (2001) Marcadores de tecido prostático no cão. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP*, v. 4, n. 3, p. 63-70, 2001.

Souza FF. Proteínas do sêmen do cão são importantes ou não na fertilização? *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v. 31, n. 1, p.108-114, 2007.

Wang M. Neutersol: intratesticular injection induces sterility in dogs. In: *Proceedings of the International Symposium on Non-surgical Methods for Pet Population Control. Alliance for Contraception in Cats and Dogs*, Callaway Gardens, Pine Mountain, Georgia, pp. 62–65, 2002.

Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil and J.D. Neill, eds. (Raven Press, New York), pp. 189–317, 1994.

5. CONCLUSÃO

Nos últimos anos, a evolução das biotécnicas reprodutivas tem permitido um grande avanço no conhecimento da fisiologia reprodutiva dos animais domésticos. No entanto, quando se trata de reprodução de caninos pouco se tem estudado.

A castração química através da injeção intratesticular de gluconato de zinco é o que se tem de mais novo quando o assunto é esterilização química. A eficácia deste método, já foi comprovado na literatura científica. No entanto, não existe nada publicado que relacione esta técnica com alterações da concentrações proteíca do plasma seminal.

Os achados deste estudos, permitiram concluir que a partir dos 150 dias pós-castração química a concentração proteíca do plasma seminal aumenta. Ou seja, a composição deste fluido é alterada. Além disso, foi possível comprovar que a arginina esterase permanece em altas concentrações mesmo com o animal castrado quimicamente.

Esses dados, além de contribuir para os avanços da biologia molecular tendo em vista que foi o primeiro trabalho onde descreveu-se o mapa eletroforético de proteínas do plasma seminal de cães. Também, demonstra a necessidade de outras pesquisas que relacionando a castração química e o estudo proteômico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLEROVA, L., BARTOSKOVA, A. Lactoferrin: a review. (2008) **Veterinary Medicina**, 53:457–468.

AIUDI, G.; SILVESTRE, F.; LEOCI, R.; LACALANDRA, G.M. (2010) Single testicular injection Chlorhexidine solution as a chemical sterilant in dogs. In: **International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods for Pet Population Control**, 4., 2010, Dallas, TX. *Anais ...* Dallas, TX: ACC & D.

BAKER, E.N. Structure and reactivity of transferrins. (1994) **Advances in Inorganic Chemistry**, 41: 389–463.

BAKER, E.N.; BAKER, H.M. (2005) Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 62:2531–2539.

BARSANTI, J.A.; FINCO, D.R; Moléstias Prostáticas do cão. (1992) In: ETTINGER, S.J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3.ed. São Paulo: Manole. 4:1941-63.

BARAN, A.; OZDAS, O.B.; GULCUBUK, A.; HAMZAOGLU, A.I.; TONGUC, M. (2010) Pilot study: intratesticular injection induces sterility in male cats. In: **International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods for Pet Population Control**. 4, 2010, Dallas, TX. *Anais ...* Dallas, Texas: ACC & D.

BJORND AHL, L.; KVIST, U. (1990) Influence of seminal vesicular fluid on the zinc content of human sperm chromatin. **Int J Androl** 13: 232-237.

BLANC, P.; WONG, H.; BERNSTEIN, M.S. (1991) An experimental human model of metal fume fever. **Ann Intern Med**, 114: 930-936.

BREDFORD, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, L.T.; OLIVEIRA, E.C.S.(2001) Avaliação de um nutracêutico na eficiência reprodutiva de cães machos. **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, 9(31):1-37.

BUTLER, W.T. (1995) Structural and functional domains of osteopontin. **Annals of the New York Academy Sciences**, 760:6-11.

CALVETE, J.; SANZ, L.; REINERT, M.; DOSTALOVA, Z.; TOPFER-PETERSEN, E. (1995) Heparin-binding proteins on bull, boar, stallion, and human spermatozoa. **Mem Mus Nat Hist Nat**, 166:515–24 [abstract].

CALVETE, J.J.; CARRERA, E.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E. (1996) Boar spermadhesins AQN-1 and AQN-3: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. **Biology Chemistry**, 377:521-527.

CHANDONNET, L.; ROBERTS, K.D.; CHAPDELAINÉ, A.; et al. (1990) Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. **Molecular Reproduction Development**, 26:13–8.

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

CHAPDELAINÉ, P.; HO-KIN, M.A.; TREMBLAY, R.R.; DUBÉ, J.Y. (1988) Nucleotide sequence of the androgen-dependent arginine esterase mRNA of canine prostate. **Febs Letters**, 232(1):187-192.

DACHEUX, J.; CASTELLA, S.; GATTI, J.L.; DACHEUX, F. (2005) Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, 63:319–341.

DENHARDT, D.T; GUO, X. (1993) Osteopontin: a protein with diverse functions. **FASEB J**, 7:1475–1482.

D'CRUZ, O.J. (1996) Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: relevance to infertility. **Frontiers in Bioscience**, 1:61-176.

DUBE, J.Y.; FRENETTE, G.; CHAPDELAIN, P.; PAQUIN, R.; TREMBLAY, R.R. (1985) Biochemical characteristics of the proteins secreted by dog prostate, a review. **Experimental Biology**, 43:149-159.

DUBÉ, J.Y.; LAZURE, C.; TREMBLAY, R.R. (1986) Dog prostate arginine esterase is related to human prostate specific antigen. **Clinical Investigative Medicine**, 9:51–54.

DUBÉ, J.Y. (1994) Prostatic kallikreins: biochemistry and physiology. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 107:13–20.

ELOY, Â.M.X.; FURTADO, J.R. (2013) Marcadores de Congelabilidade no Plasma Seminal de Caprinos - Estudos Preliminares. Disponível em <http://www.cnpc.embrapa.br>. Acesso em Janeiro de 2013.

ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.A.; MIDDLETON, D.J. (1990) An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. *Research in Veterinary Science*, 49:66-70.

ERIKSON, D.W.; WAY, A.L.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. (2007) Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. **Reproduction**, 133:909–917.

FAHIM, M.S.; WANG, M.; SUTCU, M.F.; FAHIM, Z.; YOUNGQUIST, R.S. (1993) Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. **Contraception**, 47(1):107-22.

FAYRER-HOSKEN, R.A.; DOOKWAH, H.D.; BRANDON, C.I. (2000) Immunocontrol in dogs. **Animal Reproduction Science**, 60:365–373.

FOXCROFT et al. (2008) Identifying uneable semen. **Theriogenology**, 70:1324-1336.

FRANZEN, A.; HEINEGARD, D. (1985) Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bovine calcified matrix. **Biochemical Journal**, 232:715-724.

FRAZER, G.S.; BUCCI, D.M. (1996) Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, 46:1389–402.

FRENETTE, G.; DUBE, J.Y.; MARCOTTE, J.R.; TREMBLAY, R.R. (1985) Arginine esterase from isolated dog prostate secretory granules is fully active enzymatically. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, 63:1603-1607.

FURMANSKI, P.H.J. (1985) Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. **Nature**, 23:721-724.

GOBELLO, C.; CASTEX, G.; CORRADA, Y. (2002) Serum and seminal markers in the diagnosis of disorders of the genital tract of the dog: a mini-review. **Theriogenology**, 57:1285-1291.

GONÇALVES, R.F.; STAROS, A.L.; KILLIAN, G.J.(2008) Oviductal fluid proteins associated with the bovine zona pellucida and the effect on in vitro sperm-egg binding, fertilization and embryo development. **Reproduction Domestic Animal**, 43:720-729.

HEDGER, M.P.; MEINHARDT, A. (2003). Cytokines and the immune-testicular axis. **J. Reprod. Immunol.** 58:1–26.

HENKEL, R.; BITTNER, J.; WEBER, R.; HUTHER, F.; MISKA, W. (1999) Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. **Fertil Steril** 71: 1138-1143.

HENKEL, R.; BALDAUF, C.; SCHILL, W.B. (2003) Resorption of the element zinc from spermatozoa by the epididymal epithelium. **Reprod Domest Anim** 38: 97-101.

HIRON, M.; HARSHAN, L.P.; SINGH, A.; ARANGASAMY, M.R. (2006) Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, 93:124-133.

IMMEGART, HI; THRELFALL, W.R. (2000) Evaluation of intratesticular injection of glycerol for nonsurgical sterilization of dogs. **Am. J. Vet. Res.**, 61:544-549.

ISAACS, J.T.; ISAACS, W.B.; COFFEY, D.S. (1980) Differential effects of estrogens treatment on canine seminal plasma components. **Investigative Urology**, 17:495-498.

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

JANA, K.; SAMANTA, P.K.(2011). Clinical evaluation of non-surgical sterilization of male cats with single intratesticular injection of calcium chloride. **BMC Vet. Res.**, 7:1–15.

JOBIM, M.I.M.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C.(2009) Marcadores protéicos de fertilidade no plasma seminal e na membrana plasmática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 6:11-19.

JOHNSON, L.; WIKSTROM, S.; NYLANDER, G. (1969) The vehicle for zinc in the prostatic secretion of dogs. **Scandinavian Journal Urology Nephrology**, 3: 9-11.

JOHNSTON, S.D.; ROOT, K.; OLSON, P.N.S.(2001) Breeding management and artificial insemination of the bitch. In: **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: WB Saunders, p.41-65.

JULIE, K.; LEVY, D.V.M.; CRAWFORD, P. C.; APPEL, L. D.; EMMA, L.; CLIFFORD, B.A. (2008) Comparison of intratesticular injection of zinc gluconate versus surgical castration to sterilize male dogs. **AJVR.**, 69(1):140-143.

KELLOKUMPU, S; RAJANIEMI, H. (1981) Effect of zinc on the uptake of human chorionic gonadotropin (LCG) in rat testis and testosterone response in vivo. **Biology Reproduction.**, 24:298.

KVIST, U.; KJELBERG, S.; BJO'RND AHL, L.; SOUFIR, J.C.; ARVER, S. (1990) Seminal fluid from men with agenesis of the Wolffian ducts: zinc-binding properties and effects on sperm chromatin stability. **International Journal Andrology**, 13: 245-252.

KERR, J.M.; FISHER, L.W.; TERMINE, J.D. (1991) The cDNA clone and distribution of bovine osteopontin. **Gene**, 108:237-243.

KIKUCHI, M.; MIZOROKI, S.; KUBO, T.; OHIWA, Y.; KUBOTA, M.; YAMADA, N.; ORINO, K.; OHNAMI, Y.; WATANABE, K. (2003) Seminal plasma lactoferrin but not transferrin reflects gonadal function in dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 65:679-684.

KLAUSNER, J.S.; BELL, F.W.; HAYDEN, D.W.; JOHNSTON, S.D.; LUND, E.M.(1994) Recent developments in the diagnosis and treatment of BPH and prostatic carcinoma. **Proceedings American College of Veterinary Internal Medicine**, 547-8.

KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B.(2005) Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal Reproduction Immunology**, 65:33-46.

KUO, Y.H.; CHENG, W.T.K.; TU, C.F.; WU, S.C.; CHEN, H.T.; HSIEH, S.H.(2000) Motility and fertility of frozen semen from normal and transgenic boars with or without transgene. **Ajas, Asian-Aust J Anim Sci** 13(Suppl vol A):74.

LEAKE, A.; CHISHOLM, G.D.; HABIB, F.K. (1984) The effect of zinc on the 5 α -reduction of testosterone by the hyperplastic human prostate gland. **J. Steroid. Biochem.**, 20:651-655.

LENZ, R.W.; BALL, G.D.; LOOHSE, J.K.; FIRST, N.L.; AX, R.L. (1983) Chondroitin sulfate facilitates an acrossome reaction in bovine spermatozoa. **Biology Reproduction**, 28:683-685.

LEONARD, A; GERBER, GB; LEONARD, F. (1987) Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of zinc. **Mutat Res.**, 168:343-348.

LEVAY, P.F.; VILJOEN, M. (1995) Lactoferrin: a general review. **Haematologica**, 80: 252–267.

LEVY, J.K.; MILLER, L.A.; CRAWFORD, P.C, et al. (2004) GnRH immunocontraception of male cats **Theriogenology**, 62:1116-1130.

LINDHOLMER, C.; GLAUMAN, H. (1972) Zinc and magnesium in human male reproductive tract. **Andrologie**, 4:231-237.

LONNERDAL, B.; IYER, S. (1995) Lactoferrin: molecular structure and biological function. **Annual Review of Nutrition**, 15:93–110.

LORENA, S.E.R.S.; LUNA, S.P.L.; RODRIGUES, D.; LIMA, A.F. (2010). Avaliação algica do gluconato de zinco injetado por via intratesticular para a contracepção química em cães Disponível em <http://www.infertile.com.br> Acessado em 19 de Abril de 2011.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. (1981) Male Reproductive Function and Semen. Themes and Trends in Physiology, **Biochemistry and Investigative Andrology**. New York: ED. Springer- Verlag, 495p.

MARTINS MIM, SOUZA FF, LOPES MD. (2002) Eletroforese das proteínas do fluido epididimal canino: Dados preliminares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 26(2):72-75.

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

MASSON, P.L.; HEREMANS, J.F.; DIVE, C. (1966) An iron-binding protein common to many external secretions. **Clinica Chimica Acta**, 14:735–739.

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

METZ-BOUTIQUE, M.H.; JOLLES, J.; MAZURIER, J.; SCHOENTGEN, F.; LEGRAND, D.; SPIK, G.; MONTREUIL, J.; JOLLES, P. (1984) Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. **European Journal of Biochemistry**, 145:659–676, 1984.

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

MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, M.; FRASER, L.; CZARZASTA, J.; KORDAN, W. (2012) Isolation and characterization of zinc-binding proteins of canine seminal plasma. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, 15(3):493-498, 2012.

Moura, A.A. (2005) Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: the case for osteopontin. **Animal Reproduction**, 2:3-10.

Moura, A.A.; Andrade, C.R.; Souza, C.E.A.; Rêgo, J.P.A.; Martins, J.A.M.; Oliveira, R.V.; Menezes, E.B.S. (2011) Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprod Animal**, 35(2):139-144.

NEUTERSOL. (2003) Dose Determination Study. Freedom Information Summary. **NADA**, p. 141-217. United States Food and Drug Administration.

NISHIMURA, N; KAWATE, N; SAWADA, T. (1992) Chemical castration by single intratesticular injection of lactic acid in rats and dogs. **Journal Reproduction Development**, 38:263-266.

NOZAKI, A.; TANAKA, K.; NAGANUMA, A.; KATO, N. (2002) Recent advances of basic research and clinical application of lactoferrin as an antiviral reagent against chronic hepatitis C. **Nippon Rinsho**, 60:819-829.

O'BRYAN, M.K.; SCHLATT, S.; PHILLIPS, D.J.; KRETZER, D.M.; HEDGER, M.P. (2000) Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. **Endocrinology** 141: 238–246.

OLIVEIRA, E.C.S.; MOURA, M.R.; SILVA JÚNIOR, V.A.; PEIXOTO, C.A.; SARAIVA, K.L.A.; SÁ, M.J.C.; DOUGLAS, R.H.; MARQUES JÚNIOR, A.P. (2007) Intratesticular injection of a zinc-based solution as a contraceptive for dogs **Theriogenology**, 68:137–145.

OLIVEIRA, E.C.S.; MULLER, P.M.; SILVA, F.L.M.; NERY, L.T.B.; SÁ, M.J.C.; GUERRA, M.M.P.; ESQUERRE, K.P.O.; KASTELIC, J.P.; DOUGLAS, R.H. (2012) Oral administration of an anti-inflammatory does not compromise the efficacy of intratesticular injection of zinc gluconate as a contraceptive for dogs. **Animal Reproduction Science**, 132:207–212.

PARRISH, J.J.; FIRST, N.L. Fertilization. In: King GJ, Neimann-Sorensen A, Tribe DE. World animal science—Reproduction in domesticated animals. New York: Elsevier, 1993. p.195-227.

PEARL, C.A.; ROSER, J.F. (2008) Expression of lactoferrin in the boar epididymis: Effects of reduced estrogen. **Domestic Animal Endocrinology**, 34:153–159, 2008.

PILCH, B.; MANN, M. (2006) Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. **Genome Biology**, 7:1-10.

PINEDA, AM.H; REIMERS, T.J.; FAULKNER, L.C.; HOPWOOG, M.L.; SEIDEL, G.E. (1977) Azoospermia in dogs induced by injection of sclerosing agents into the caudae of the epididymides. **American Journal Veterinary Research**, 38(6): 831-838.

PINEDA, M.H; DOOLEY, M.S. (1984) Surgical and chemical vasectomy in the cat. **American Journal Veterinary Research**, 45 (2):291-300.

REDDY, M.M.; MAHIPAL, S.V.; SUBHASHINI, J.; REDDY, M.C.; ROY, K.R.; REDDY,G.V.; REDDY,P.R.; REDDANNA, P. (2006). Bacterial lipopolysaccharide induced oxidative stress in the impairment of steroidogenesis and spermatogenesis in rats. **Reproduction Toxicology** 22:493–500.

REINERT. M.; CALVETE, J.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E. (1997) Immunohistochemical localization in the stallion genital tract, an topography on spermatozoa of seminal plasma protein SSP-7, a member of the spermadhesin protein family. **Andrology**, 29:179–86.

ROTA, A.; MILANI, C.; ROMAGNOLI, S. (2007) Effect of post-thaw dilution with autologous prostaticfluid on dog semen motility and sperm acrosome status. **Theriogenology**, 67:520-525.

SILVA, F.L.M.; BRITO, L.T; MULLER, P.M.; ARAUJO, B.; SÁ, M.J.C., OLIVEIRA, E.C.S. (2010a) Sterilization of dogs with intratesticular injection of a zinc

based solution – Histopathological evaluation of acute and chronic phase. **Animal Reproduction**, 7: 230.

SILVA, F.L.M.; MULLER, P.M.; SILVA, L.G.; MOURA, M.R.; SÁ, M.J.C.; MARQUES, JR. A.P. (2010b) Efeito da administração oral de dipirona sódica em cães submetidos à esterilização química por meio da injeção intratesticular de gluconato de zinco: resultados preliminares. In: Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal, 5, 2010, Patos, PB. *Anais...* Patos, PB: **CONERA**, 2010b.

SOTO, F.R.M.; VIANA, W.G.; SOUSA, A.J.; PINHEIRO, S.R.; MUCCIOLO, G.B.; HOSOMI, F.Y.M.; AZEVEDO, S.S.; DIAS, R.A. (2007). Evaluation of zinc gluconate, either associated or not to dimethyl sulphoxide as contraceptive method for male dogs. **Animal Reproduction** 4:119–124.

SOTO, F.R.M.; VIANA, W.G.; MUCCIOLO, G.C.B.; HOSOMI, F.Y.M.; VANNUCCHI, C.I.; MAZZEI, C.P.; EYHERABIDE, A.R.; FÁTIMA LÚCIO,C.; DIAS, R.A.; AZEVEDO, S.S. (2009) Evaluation of Efficacy and Safety of Zinc Gluconate Associated with Dimethyl Sulphoxide for Sexually Mature Canine Males Chemical Neutering. **Reproduction Domestic Animal**, 44:927–931.

SORENSEN, E.S.; PETERSEN, T.E. (1993) Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, 60:198-197.

SOUZA, F.F.; TONIOLLO, G.H. (2001) Marcadores de tecido prostático no cão. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, 4(3):63-70.

SOUZA, F.F. (2003) Caracterização eletroforética do perfil proteico e análise bioquímica do plasma seminal canino. **Tese**. Botucatu, Brazil: faculdade de Medicina Veterinária e Ciência Animal, UNESP; 98 pp.

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

SOUZA, F.F. (2007) Proteínas do sêmen do cão são importantes ou não na fertilização? **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 31(1): 108-114.

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

SOUZA, F.F.; CHIRINÉA, V.H.; MARTINS, M.I.M.; LOPES, M.D. (2009) Osteopontin in Seminal Plasma and Sperm Membrane of Dogs. **Reproduction Domestic Animal**, 44(2):283–286.

YANAGIMACHI, R. (1994) Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil and J.D. Neill, eds. (Raven Press, New York), pp. 189–317.

YAMASHIRO, H.; NARITA, K.; SUGIMURA, S.; SUGAWARA, A.; HOSHINO, Y.; SAKURAI, M.; YOKOO, M.; KONNO, T.; YOSHIDA, M.; SATO, E. (2009) Influence of the Prostatic Fluid from the First and Third Fractions of the Ejaculates on the Cryosurvival of Poodle Dog Sperm. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, 4(1):14-20.

WANG, M. (2002) Neutersol: intratesticular injection induces sterility in dogs. In: *Proceedings of the International Symposium on Non-surgical Methods for Pet Population Control*. Alliance for Contraception in Cats and Dogs, Callaway Gardens, Pine Mountain, Georgia, pp. 62–65.

WANG, M. (2004) Neutersol: from laboratory to market. In: *Proceedings of the International Symposium on Non-surgical Methods for Pet Population Control*. Alliance for Contraception in Cats and Dogs, 2004. *Anais...Alexandria*, 2004, pp. 165–169.

