

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**

**TAINÁ HORTÊNCIA OLIVEIRA PESSOA**

**PADRONIZAÇÃO DO SISTEMA DE ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE  
SÊMEN (CASA) PARA AVALIAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EQUINO  
CRIOPRESERVADOS.**

**ILHÉUS – BAHIA**

**2016**

**TAINÁ HORTÊNCIA OLIVEIRA PESSOA**

**PADRONIZAÇÃO DO SISTEMA DE ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE  
SÊMEN (CASA) PARA AVALIAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EQUINO  
CRIOPRESERVADOS.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Produção e Comportamento Animal

Orientador: Profa. Dra. Paola Pereira das Neves Snoeck.

**ILHÉUS – BAHIA**

**2016**

**TAINÁ HORTÊNCIA OLIVEIRA PESSOA**

**PADRONIZAÇÃO DO SISTEMA DE ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE  
SÊMEN (CASA) PARA AVALIAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EQUINO  
CRIOPRESERVADOS.**

Ilhéus - BA 30/06/2016

---

Paola Pereira das Neves Snoeck – Dsc  
UESC - DCAA  
(Orientadora)

---

Sildivane Valcácia Silva - Dsc  
CBIOTEC-UFPA

---

Sandra Cristina Becker Silva - Dsc  
DCAA-UESC

**ILHÉUS-BAHIA**

## DEDICATÓRIA

A minha avó Leonilha Maria (*in Memoriam*) pelo exemplo de como se viver com simplicidade, felicidade, honestidade e pela dedicação na criação dos filhos e netos. Pelas constantes orações!

## AGRADECIMENTOS

A Deus todo louvor pela permissão da vida e por ser o sustento principal em minha caminhada.

Aos meus pais, Pedro Pessoa e Irene Pessoa, por serem exemplos de caráter e dignidade. Pela confiança ofertada e pela preocupação de me ensinar todos os princípios e valores que o ser humano deve ter.

Aos meus irmãos Alexsandro Pessoa e Diego Pessoa pelo companheirismo durante a minha trajetória, por me apoiarem de forma inigualável, mesmo longe se tornaram presentes.

A minha professora, orientadora Paola Snoeck por colaborar em meu crescimento profissional e pessoal. Dentre todas as virtudes sua paciência, disponibilidade, preocupação e cobranças me impulsionaram a almejar sempre o melhor e dessa forma minha admiração e respeito cresce a cada dia.

Aos amigos do Grupo de Estudos em Reprodução Animal - GERA, Danielle Dutra, Ivan de Paula, João Fillipe Silva, Larissa Rodrigues, Maíra Corona e William Moraes pela troca de conhecimento e grande ajuda na realização do projeto. Em especial a Cristiane Aguiar e Celso Henrique Barros pela colaboração e parceria.

Aos professores do PPGCA, pela disponibilidade e aos colegas pelo companheirismo durante essa jornada.

Aos amigos Aline Sena, Amanda Teixeira, Amanda Damasceno, Antenor Bento, Cláudia Anjos, Camila Abreu, Erika Chausse, Graziela Baroni, Hellen Fehlberg, Ione Ferreira, Michele Brito, Milane Ribeiro, Pedro Alcântara, Philippe Brito, Rebeca Silvi, Valcei Luz por compartilharem todas as dificuldades e angústias e pelo momentos agradáveis.

Muito obrigada a todos

# **PADRONIZAÇÃO DO SISTEMA DE ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE SÊMEN (CASA) PARA AVALIAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EQUINO CRIOPRESERVADOS.**

## **RESUMO**

O sistema de análise computadorizado de sêmen (CASA) é uma ferramenta importante para avaliação da cinética espermática fornecendo informações precisas, objetivas e com alta repetibilidade. Entretanto, existe alguns fatores que interferem nos resultados da cinética espermática. Este trabalho foi dividido em quatro experimentos, o primeiro foi realizado para avaliar o efeito da velocidade de 25 imagens capturadas por segundo com uma velocidade de captura de 25, 30 e 50 Hz. As velocidades de capturas de imagem/segundo utilizadas não afetaram a cinética dos espermatozoides ( $P > 0,05$ ). O segundo experimento avaliou o efeito das câmaras (lâmina sob lamínula, Leja®10, Leja®20) sob a cinética espermática. Os tipos de câmaras utilizadas influenciaram os parâmetros de MP, Médios, Lentos, VSL, LIN, STR, WOB e Hiperativos ( $P < 0,05$ ). O terceiro experimento avaliou o efeito das concentrações espermáticas de (25, 50 e  $100 \times 10^6$ ) sob a cinética espermática. As diferentes concentrações empregadas influenciaram nos resultados de MT, MP, Médios, LIN, STR e BCF ( $P < 0,05$ ). O uso da concentração espermática de  $100 \times 10^6$  resultou em maior percentual de MP, já o uso das concentrações de 25 e  $50 \times 10^6$  resultou em maior LIN, STR e BCF ( $P < 0,05$ ). O quarto experimento avaliou o efeito dos diluidores (BotuCrio®, BotuSêmen®, TALP *sperm*, Solução fisiológica) e o emprego das concentração espermática de 25 e  $50 \times 10^6$  sob a cinética espermática. Os diluidores influenciaram significativamente os parâmetros MT, MP, Rápidos, VCL, STR, ALH, BCF e Hiperativos, independente da concentração empregada ( $P < 0,05$ ). O emprego do BotuCrio® resultou em maiores valores de MT, MP, Médios, STR, Hiperativos e BCF quando comparado aos demais ( $P < 0,10$ ). Houve interação entre diluidor e concentração espermática principalmente quando foi utilizado Solução fisiológica e uma concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL, obtendo assim maiores valores de VSL, VAP, LIN.

Com base nos resultados obtidos é indicado para avaliação do sêmen equino criopreservado pelo SCA® uma velocidade de captura de 25 imagens/segundo com frequência de 50Hz. O uso da lâmina sob lamínula pode ser utilizada na análise do sêmen pelo SCA®. O sêmen deve ser diluído para obtenção de uma concentração espermática adequada. Indica-se o emprego de uma concentração entre 25 e 50x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. Para rediluição e ajuste da diluição é recomendado preferencialmente o diluidor utilizado na congelação, seguido de TALP *sperm* e como terceira opção Solução fisiológica.

**Palavras-chave: SCA®. Motilidade. Cinética. Congelação. Equino.**

## **STANDARDIZATION OF SPERM COMPUTERIZED ANALYSIS SYSTEM (CASA) FOR EQUINE SPERMATOZOA CRYOPRESERVED ASSESSMENT.**

### **ABSTRACT**

The automated analysis of semen (CASA) is an important tool for evaluation of sperm kinetics providing accurate, objective and repeatable. However, there are some factors that affect the results of sperm kinetics. This work was divided into four experiments, was first performed to evaluate the effect of the rate of 25 images captured per second with a capture rate of 25, 30 and 50 Hz. Speeds snapshots/second used does not affect the kinetics of sperm ( $P > 0.05$ ). The second experiment evaluated the effect of the chambers (slide under cover slip, Leja®10, Leja®20) under the spermatoc kinetics parameters. The types of cameras used have influenced the parameters of MP, Medium, Slow, VSL, LIN, STR, WOB and Hyperactive ( $P < 0.05$ ). The third experiment evaluated the effect of sperm concentrations (25, 50 and  $100 \times 10^6$ ) under sperm kinetics parameters. Different concentrations employed influenced the results of MT, MP, Medium, LIN, STR and BCF ( $P < 0.05$ ). The use of  $100 \times 10^6$  sperm concentration resulted in a higher percentage of PM, since the use of 25 and  $50 \times 10^6$  concentrations resulted in greater LIN, STR and BCF ( $P < 0.05$ ). The fourth experiment evaluated the effect of extender (BotuCrio®, BotuSêmen®, TALP sperm, physiological solution) and the use of sperm concentration of 25 and 50 under  $\times 10^6$  sperm kinetics. Extenders significantly influenced the MT parameters, MP, Rapid, VCL, STR, ALH, BCF and Hyperactive, regardless of the concentration used ( $P < 0.05$ ). The use of BotuCrio® resulted in higher values of MT, MP, Medium, STR, Hyperactive and BCF compared to the others ( $P < 0.10$ ). There was interaction between extender and sperm concentration especially when it was used physiological solution and a concentration of  $50 \times 10^6$  sperm/mL, thereby obtaining higher VSL values, VAP and LIN. Based on the results obtained is indicated for evaluation of equine semen cryopreserved by SCA® a 25 image capture/second with 50Hz frequency of capture. The use of the slide under the coverslip can be used in semen analysis by SCA®. The semen must be diluted

to obtain the desired sperm concentration. It is indicated the use of a concentration between 25 and 50x10<sup>6</sup> sperm/mL. For redilution and dilution adjustment is preferably recommended extender used in freezing process, followed by TALP sperm and as a third option Saline solution.

**Keywords: SCA®. Motility. Kinetics. Freezing. Equine.**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Média e desvio padrão da cinética dos espermatozoides equino criopreservados avaliados nas diferentes velocidades de captura de imagem (25/25 Hz, 25/30 Hz, 25/50 Hz) pelo SCA® (CASA)..... 37
- Tabela 2. Média e desvio padrão da cinética dos espermatozoides equino criopreservados avaliados em diferentes câmaras pelo SCA® (CASA) com velocidade de 50 Hz de captura de 25 imagens/segundo..... 38
- Tabela 3. Média e desvio padrão da cinética dos espermatozoides equino criopreservados avaliados nas diferentes concentrações espermáticas de 25, 50 e 100x10<sup>6</sup>/mL pelo SCA® (CASA)..... 39
- Tabela 4. Média e desvio padrão da cinética dos espermatozoides equino criopreservados avaliados pelo SCA® (CASA) utilizando diferentes diluidores (BotuCrio®, BotuSêmen®, TALP *sperm* e Solução fisiológica) e concentrações (25 e 50 x10<sup>6</sup>/mL)..... 41

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

ALH- Amplitude do deslocamento lateral da cabeça

CASA- Computer Assisted Sperm Analyzer

BCF- Batimento Flagelar Cruzado

°C- Grau Celsius

DNA- Ácido desoxiribonuclíico

Hz- Hertz

LDL- Low density lipoproteins

LIN- Linearidade

mL- Mililitro

MP- Motilidade Progressiva

MT- Motilidade Total

NaCl- Cloreto de sódio

pH- Potencial Hidrogênico

s- segundo

STR- Retilinearidade

VAP- Velocidade média da trajetoria

VCL- Velocidade curvilinear

VSL- Velocidade linear progressiva

WOB- Index de oscilação

µm- microlitro

%- porcentagem

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 OBJETIVOS .....	15
2.1 Objetivo.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	17
3.1 Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA) .....	17
3.1.1 Bases gerais do CASA .....	19
3.1.2 A importância da avaliação da cinética espermática .....	20
3.1.3 Aplicações do CASA .....	22
3.1.4 Vantagens e desvantagens do CASA .....	22
3.2 Fatores que interferem na avaliação na avaliação utilizando o CASA. ...	23
3.2.1 Temperatura.....	23
3.2.2 Câmara de contagem .....	24
3.2.3 Concentração espermática.....	26
3.2.4 O diluidor.....	28
3.2.5 Frequência de aquisição de imagem.....	29
3.3 Padronização das técnicas para avaliação de sêmen com o CASA .....	31
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
4.1 Experimento 1 .....	34
4.1.1 Efeito da velocidade de captura de 25 imagem/segundo na cinética espermática .....	34
4.2 Experimento 2 .....	34
4.2.1 Efeito dos tipos de câmaras na cinética espermática .....	35
4.3 Experimento 3 .....	35
4.3.1 Efeito da taxa de diluição na cinética espermática.....	35
4.4 Experimento 4 .....	35
4.4.1 Efeito do diluidor na cinética espermática.....	35
4.5 Análise Estatística.....	36
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
5.1 Experimento 1 .....	36

5.2 Experimento 2 .....	37
5.3 Experimento 3 .....	38
5.4 Experimento 4 .....	39
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
6.1 Experimento 1 .....	42
6.2 Experimento 2 .....	44
6.3 Experimento 3 .....	46
6.4 Experimento 4 .....	47
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A equinocultura vem se destacando nos últimos tempos em alguns segmentos como: esporte, lazer e equoterapia, sendo uma importante fonte geradora de emprego e renda. O Brasil possui o maior rebanho equino da América Latina com 5.508.546 animais desta espécie. A indústria do cavalo movimentou um montante de 7,5 bilhões de reais por ano na economia nacional (IBGE, 2011; LIMA et al., 2012).

Devido ao crescimento e aumento da demanda na criação de equinos, tem surgido a necessidade do aprimoramento de técnicas reprodutivas que possibilitem um melhor aproveitamento do potencial produtivo e a promoção do melhoramento genético desta espécie (BRANDÃO, 2008). Atualmente, as técnicas de reprodução assistida como a inseminação artificial e a criopreservação de sêmen pelo resfriamento ou congelamento tem impulsionado pesquisas com o objetivo de aperfeiçoar a sua aplicabilidade e incrementar os índices de fertilidade obtidos a campo.

Os avanços crescentes nos protocolos de criopreservação e diluidores seminais, dentre outros, têm aumentado a utilização da inseminação artificial nesta espécie nos últimos anos. Esta técnica permite a otimização de garanhões e a possibilidade de inseminar éguas em diferentes regiões e até mesmo diferentes países. Assim, a utilização do sêmen resfriado e congelado pode maximizar o uso de garanhões com genética superior e melhoradores de determinadas características raciais, além de possibilitar a formação de germoplasmas de raças ameaçadas de extinção (AMANN; PICKET, 1987).

Na avaliação da viabilidade espermática a motilidade, a concentração e a morfologia continuam sendo os atributos relevantes na identificação de amostras seminais com potencial fecundante. Devido à importância da avaliação da cinética espermática, pesquisadores buscaram a elaboração de um equipamento automatizado capaz de analisar esses parâmetros de forma objetiva e rápida (MACK et al., 1988; KATILA, 2001; EHLERS et al., 2011).

## 2 OBJETIVOS

## **2 1 Objetivo Geral**

Padronização do uso do sistema de análise computadorizado (CASA, SCA®) para avaliação do sêmen equino criopreservado.

## **2 2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito da velocidade de captura de 25 imagens/segundo na cinética espermática.
- Avaliar o efeito dos tipos de câmaras na cinética espermática.
- Avaliar o efeito da taxa de diluição na cinética espermática.
- Avaliar o efeito de diluidores na cinética espermática.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA)

É um sistema automático de software e hardware utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações precisas e significativas do movimento individual de cada célula, bem como a identificação de diferentes subpopulações espermáticas com alto grau de repetibilidade (VERSTEGEN et al., 2002; AMANN; KATZ, 2004).

O CASA apresenta como componentes um microscópio de contraste de fase conectado a uma câmera de vídeo, que captura imagens digitais formando uma sequência de imagens de diferentes campos. Após a sua aquisição, as direciona para um computador com um software específico instalado e são analisadas automaticamente campo a campo, desenhando o movimento de cada espermatozoide para reconstruir a trajetória percorrida. Com o uso deste equipamento é possível identificar e acompanhar o percurso de cada célula espermática e obter resultados relacionados a sua motilidade e as características de sua trajetória e cinética (MORTIMER, 2000; VERSTEGEN et al., 2002).

O movimento espermático é originado pelo batimento flagelar, o qual apresenta uma frequência muito elevada, sendo de até 80 batimentos por segundo para espermatozoides de humanos. Portanto, a avaliação é realizada através da captura da trajetória da cabeça dos espermatozoides, porque tecnicamente é mais fácil acompanhar esse movimento (MORTIMER, 2000; AMANN; KATZ, 2004).

Para que ocorra a captura da imagem do espermatozoide pela câmera digital é necessária a utilização de um microscópio de contraste de fase de campo escuro, para melhor percepção dos espermatozoides que emitem um brilho sobre o fundo escuro. O sistema reconhece a cabeça do espermatozoide devido a uma padronização no tamanho mínimo e máximo da cabeça já estabelecido para as espécies. Se na amostra a ser avaliada tiver sujidades, que se enquadre dentro desse limite esperado para uma cabeça de espermatozoide,

essas serão capturados e contabilizadas como célula espermática, fato que pode ser uma possibilidade de erro na análise pelo sistema (MORTIMER, 2000).

Os parâmetros fornecidos pelo sistema CASA apresentam uma terminologia padronizada desde 1988 após encontros realizados pela Sociedade Americana de Andrologia em Houston no Texas e a Federação CECOS (Centre d'Etude et de Conservation du Sperme Humain) em Montpellier na França e estes são relacionados abaixo (MORTIMER, 1997; VERSTEGEN et al., 2002).

Velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$ ): é a velocidade real do espermatozoide, mensurada ponto a ponto ao longo do trajeto da célula espermática. Esse valor é sempre o mais alto dos três valores de velocidade.

Velocidade média da trajetória (VAP-  $\mu\text{m/s}$ ): velocidade da trajetória média do espermatozoide.

Velocidade linear progressiva (VSL-  $\mu\text{m/s}$ ): velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide. Esta é sempre a mais baixa das três velocidades para qualquer espermatozoide.

Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH-  $\mu\text{m}$ ): é a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide.

Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF-Hz): é a frequência que a cabeça do espermatozoide cruza a trajetória do movimento.

Linearidade (LIN- %): relação entre VSL e VCL. A linearidade estima a proximidade do trajeto do espermatozoide em linha reta.

Retilinearidade (STR-%): é a relação percentual entre VSL e VAP. A linearidade estima a proximidade do trajeto do espermatozoide em uma linha reta.

Index de oscilação (WOB): é a relação entre o caminho médio e curvilíneo calculada por  $(\text{VAP}/\text{VCL}) \times 100$ .

Os parâmetros fornecidos pelo sistema CASA que definem quantitativamente o movimento espermático são velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear progressiva (VSL) e velocidade média da trajetória (VAP)

(Figura 1). Já os parâmetros que definem a qualidade do movimento espermático são linearidade (LIN), retilinearidade (STR), index de oscilação (WOB), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e batimento flagelar cruzado (BCF).

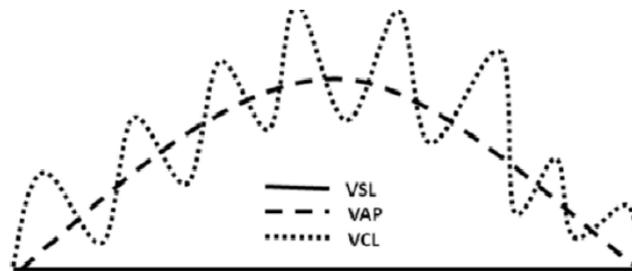


Figura 1- Representação gráfica dos parâmetros quantitativos expressos pelo CASA em uma trajetória irregular.

Fonte: MORTIMER (2000).

### 3.1.2 BASES GERAIS DO CASA

Na década de 40, pesquisadores como Lord Rothschild, J.Gray e Robert Rikmenspoel tiveram o interesse de avaliar o movimento e buscar métodos para estimar a velocidade do movimento espermático, porém, os sistemas desenvolvidos eram incapazes de mensurar a velocidade individual dos espermatozoides (MORTIMER et al. 2015).

Em 1978 surgiu o primeiro sistema automático apropriado para avaliar a trajetória do movimento do espermatozoide baseado na avaliação individual das células. Esse sistema de análise de sêmen era por computador e foi proposto pela primeira vez por Dott e Foster. Nos dias atuais é comumente utilizado em vários laboratórios de andrológia de humanos e em diferentes espécies de animais como touro, cavalo, varrão, coelho, rato e ovelhas (VERSTEGEN et al., 2002; AMANN; KATZ, 2004).

Os sistemas de análise de sêmen computadorizados foram desenvolvidos e aprimorados para proporcionar uma análise precisa. Vários já estão disponíveis comercialmente, podendo variar no modo de seu funcionamento e na capacidade de detectar e mensurar a motilidade dos espermatozoides das diferentes espécies. Os sistemas específicos para análise de sêmen comercializados são: CellSoft®, HTM 2000® Hamilton-Thorn

Research, HTM-IVOS Sperm Analyzer®, HTM-CEROS 12.1®, SCA- *Sperm Class Analyzer*®.

Os equipamentos utilizados para a composição do sistema *CASA* variam largamente entre as máquinas, ópticas e *software* usados na identificação espermática e reconstrução de sua trajetória, mas os princípios de avaliação são similares (VERSTEGEN et al., 2002).

Segundo Mortimer et al. (2015) o sistema *CASA* progrediu consideravelmente nas últimas décadas devido ao uso de câmaras digitais de alta resolução combinado com melhorias nos softwares, assim como o controle da iluminação automático/interativo, filtragem de movimento browniano, rastreamento inteligentes através de colisões e detecção de cauda. Essas mudanças favoreceram as melhorias no emprego dessa ferramenta em clínicas reprodutivas humanas e de animais domésticos.

### **3.1.3 A IMPORTÂNCIA DA AVALIAÇÃO DA CINÉTICA ESPERMÁTICA**

A avaliação da motilidade espermática é considerada um elemento importante para avaliação dos espermatozoides do ejaculado. Um dos testes mais utilizados é análise do percentual de espermatozoides móveis que apresenta como finalidade predizer a qualidade e função espermática (DOTT; FORST; 1979; VERSTEGEN et al., 2002).

Tradicionalmente para a avaliação da motilidade espermática utiliza-se o método convencional. Este método consiste na avaliação subjetiva dos espermatozoides utilizando microscópio óptico comum e deve ser realizada por um técnico experiente. Assim, Verstegen et al. (2002) e Coetzee et al. (1999) relataram uma variação de 30 a 60 % nos parâmetros de motilidade dos mesmos ejaculados, tanto de amostras de sêmen de humanos como de animais, portanto, constatando que esse tipo de análise subjetiva é imprecisa e sujeita a variabilidade.

Dessa forma, uma alternativa para reduzir essa variabilidade na análise do sêmen é utilizar o sistema de análise computadorizado, sendo esse capaz de determinar uma série de variáveis do movimento espermático como motilidade total e progressiva, velocidade curvilnear, velocidade linear progressiva, velocidade média da trajetória, linearidade, retilinearidade, frequência do

batimento flagelar cruzado e amplitude de deslocamento lateral da cabeça. Esse conjunto de variáveis correspondem a cinética dos espermatozoides e são parâmetros que não podem ser determinadas pelo olho humano (QUINTERO-MORENO et al., 2003).

Outro fato relevante relacionado a importância da determinação da motilidade espermática é que a sua qualidade é responsável por promover a propulsão do espermatozoide pelo trato reprodutivo da fêmea até atingir a tuba uterina, assim é indicada como um dos parâmetros mais importantes para predizer a capacidade fertilizante do espermatozoide (COX et al., 2006). Portanto, esse parâmetro é importante na avaliação da fertilidade do macho, podendo ser considerado um teste funcional, devido a sua relação com o potencial de energia presente no espermatozoide (QUINTERO-MORENO, 2003).

Segundo Centola (1996) os parâmetros espermáticos como a velocidade progressiva e os padrões de cinética espermática tem sido amplamente estudados e apresentam uma alta correlação com a penetração no muco cervical e penetração de ovócitos de hamster.

Oliveira et al. (2013) notaram em estudos que vários parâmetros espermáticos obtidos pelo sistema CASA são importantes para predizer a fertilidade como motilidade total, motilidade progressiva, batimento flagelar cruzado (BCF) e percentual de espermatozoides rápidos. Assim, as várias combinações dessas variáveis obtidas pelo sistema apresentam alta correlação com a fertilidade, mais do que quando analisados individualmente.

Farrel et al. (1998) verificaram uma alta correlação ( $r=0,89$  a  $0,98$ ) entre associação de alguns parâmetros do movimento espermático do sêmen de bovinos avaliados e a fertilidade utilizando o CASA. Os parâmetros que apresentaram correlação positiva foram: motilidade progressiva, LIN, BCF, VAP, VCL, VSL, STR e ALH.

Já Kathiravan et al. (2008), ao avaliarem as características espermáticas que poderiam apresentar uma relação efetiva com a fertilidade do sêmen de touros, obtiveram uma alta correlação da motilidade progressiva ( $r=0,791$ ), VAP ( $r=0,612$ ) e VSL ( $r=0,625$ ) com a fertilização. Portanto, os parâmetros cinéticos obtidos pelo CASA podem ser úteis para predizer o potencial fertilizante das amostras de sêmen.

### **3.1.4 APLICAÇÕES DO CASA**

O uso do sistema CASA tem aumentado nas últimas décadas devido aos avanços e aprimoramento das pesquisas, principalmente por ser largamente utilizado na espécie humana, onde tem sido empregado para avaliação da qualidade espermática e utilização do sêmen na reprodução assistida (VERSTEGEN et al., 2002).

O CASA tem sido considerado uma ferramenta poderosa para ser utilizada em laboratórios de análises clínicas em estudos toxicológicos. Onde é empregado na avaliação das características do movimento espermático de homens que foram expostos a substâncias tóxicas em seu local de trabalho (SCHLEH; LEONI, 2013).

Outra aplicabilidade, com sucesso por mais de 20 anos é na realização de pesquisas em espécies de animais em clínicas veterinárias ou em centros de estudos como Universidades. Nesse contexto, alguns estudos foram realizados para validar o sistema de análise de sêmen computadorizado em diferentes animais como touro, equino, suíno e cães (FARREL et al., 1998; SCHÄFER-SOMI; AURICH, 2007; HOOGEWIJS et al., 2012; GACZANZEWICZ et al., 2015). Além de ser empregado em centrais de reprodução para a determinação de números de doses a serem aplicadas na inseminação artificial (AMAN; KATZ, 2004).

Muito utilizado também na validação de técnicas de criopreservação de gametas, o qual possibilita a averiguação da viabilidade de diluidores e crioprotetores utilizados no processo de resfriamento e congelação do sêmen (ARAUJO et al., 2012)

### **3.1.5 VANTAGENS E DESVANTAGENS DO CASA**

O sistema apresenta algumas vantagens, dentre essas podemos listar a redução da possibilidade de erros por se valer de uma avaliação mais objetiva, facilidade no manuseio e configuração do sistema, possibilidade de quantificar um grande número de células com padrão de motilidade heterogêneo em um

curto período de tempo, assim fornecendo informações adicionais sobre as características de movimentação dos espermatozoides, as quais quando analisadas através da observação convencional apresenta limitação (MACK et al., 1988; FARREL et al., 1996). Somado a isso, é capaz de fornecer dados de concentração de espermatozoides/mL, morfometria, morfologia, viabilidade e fragmentação de DNA, detectando mudanças sutis nos parâmetros sob várias condições experimentais (KRAEMER et al., 1998; VERSTEGEN et al., 2002).

É potencialmente uma ferramenta poderosa para ser utilizada no laboratório de análises clínicas, fornecendo uma melhor compreensão das implicações fisiológicas das características da motilidade espermática, principalmente em estudos toxicológicos (SLOTT et al., 1993, 1995).

Apresenta alta repetibilidade entre análises, as avaliações são rapidamente executadas e os resultados são facilmente catalogados, permitindo a comparação dos mesmos com os valores considerados como padrão, podendo ser acessado e comparado por diferentes laboratórios, clínicas, empresas e universidades (FARREL et al., 1995; MATOS et al., 2008).

As desvantagens do CASA, que podem tornar seu uso limitado são o elevado custo do equipamento, necessidade de validação do sistema para avaliar amostras de sêmen de diferentes espécies, necessidade de correlação dos parâmetros com dados de fertilidade e a padronização do sistema com uso de procedimentos operacionais adequados (DAVIS; KATZ, 1993; VERSTEGEN et al., 2002). Outro aspecto a ser ressaltado é a possibilidade de possíveis erros de interpretação do sistema CASA, como por exemplo, a dificuldade de distinguir espermatozoides de debris ou partículas suspensas presentes em diluidores seminais como gotículas de gordura presentes na gema de ovo, levando a superestimação da concentração espermática e redução do percentual de espermatozoides móveis (MORTIMER, 1997).

## **3.2 FATORES QUE INTERFEREM NA AVALIAÇÃO UTILIZANDO O CASA**

### **3.2.1 TEMPERATURA**

A temperatura é um fator essencial no momento da análise dos espermatozoides. Quando as amostras são submetidas a uma redução da

temperatura ocorre uma desaceleração dos processos metabólicos celulares e no consumo de oxigênio, resultando em uma diminuição da motilidade espermática (NORMAN; HILL, 1958).

A temperatura foi identificada como um fator que pode afetar os parâmetros de motilidade e cinética espermática na avaliação pelo sistema CASA. Algumas pesquisas tem sido realizadas empregando diferentes temperaturas no momento da avaliação. Igor Ouada e Versteegen (2001) analisaram com o sistema CASA amostras de sêmen de cães, utilizando duas diferentes temperaturas (30 e 38° C) e observaram mudanças nos parâmetros de motilidade espermática, com redução dos percentuais quando empregada a temperatura de 30° C. Os melhores resultados de motilidade foram obtidos quando o sêmen foi avaliado a uma temperatura de 38 ° C.

Quando foi avaliada a temperatura ideal para análise de sêmen de humanos, no estudo realizado por Kraemer et al. (1998), foi constatado que os melhores valores de cinética espermática (VCL e VSL) foram entre 24 e 37 ° C na incubação antes da avaliação. Concluíram que é preferível o emprego de 37 ° C no momento da avaliação por ser uma temperatura mais fisiológica.

Como constatado por diversos autores, a temperatura ideal para ser empregada no momento da avaliação espermática pelo CASA, é aquela que mais se assemelha a temperatura corpórea da espécie que o sêmen é proveniente (IGOR OUADA; VERSTEGEN, 2001; VERSTEGEN et al., 2002).

### 3.2.2 CÂMARA DE CONTAGEM

A precisão da câmara de contagem é um ponto importante na avaliação do sêmen pelo CASA. O tipo de câmara pode sub ou superestimar a concentração e a motilidade espermática, isso pode ser desastroso durante o cálculo de número de doses inseminantes de uma amostra (BROEKHUIJSE et al., 2011). Segundo Versteegen et al. (2002) as fontes de erros podem ser atribuídas ao manuseio repetido, limpeza, remontagem, altura e profundidade da câmara, bem como o volume de sêmen colocado durante o preenchimento.

Diversos estudos foram realizados para avaliar o efeito do tipo de câmara para avaliação do sêmen de diferentes espécies domesticas como

touros, carneiros, garanhões e cães (IGUER-OUADA; VERSTEGEN, 2001; HOOGEWIJS et al., 2012; GLORIA et al., 2013; PALACÍN et al., 2013).

Atualmente existe um grande número de câmaras, reutilizáveis e descartáveis, disponíveis para serem utilizadas na avaliação dos espermatozoides, seja de forma manual ou computadorizada. Os diferentes tipos comercializados, indicadas como apropriadas para a avaliação espermática são: Makler® (Sefi-Medical Instrument, Haifa, Israel), Horwell®, Microcell™ (Conception Technologies, San Diego, CA), Cell-vu® (Millennium Sciences Inc., New York, NY), Micro-CeD®, Leja® (Leja Products, Nieuw-Vennep, The Netherlands). Essas câmaras possuem profundidade específica que permite a livre movimentação dos espermatozoides (SEAMAN, et al., 1996; LENZ et al., 2011; HOOGEWIJS et al., 2012). Outro aspecto que apresenta variação é o volume e formas de preenchimento distintos entre as câmaras (GLORIA et al., 2013).

A profundidade da câmara pode interferir nos resultados de concentração, pois afeta a capacidade de detecção de células pelo sistema CASA. Também é indicada como uma das causas da variação da motilidade em decorrência da restrição do deslocamento espermático, promovendo uma interação das células com as paredes da câmara. Somado a isso, alguns autores apontam a ocorrência de uma possível ação tóxica presente na cola adesiva e tintas utilizadas na fabricação, podendo influenciar nos espermatozoides que interajam com as paredes da câmara resultando em lesões na membrana espermática (VERSTEGEN et al., 2002; DOUGLAS-HAMILTON et al., 2005; GLORIA et al., 2013; CONTRI et al., 2010; KLIMOWICZS et al., 2008).

A profundidade da câmara pode variar de 10, 20 até 100  $\mu\text{m}$ . As câmaras que apresentam profundidade de 20  $\mu\text{m}$  são indicadas para avaliar espermatozoides que se apresentam capacitados, portanto com predominância de movimentos hiperativos. Já as câmaras de profundidade de 10  $\mu\text{m}$  são indicadas para avaliação de amostras que apresentam pequenas alterações no movimento espermático (LE LANNOU et al., 1992; KRAEMER et al., 1998).

Outro aspecto importante para a utilização de câmaras que apresentam profundidade menor que 20  $\mu\text{m}$  é a necessidade de se evitar que os espermatozoides se movimentem em diferentes planos focais, reduzindo

possíveis erros na captura de imagem pelo sistema CASA (VERSTEGEN et al., 2002).

As câmaras apresentam diferentes formas de preenchimento, sendo por capilaridade como a Leja® e Cell-Vu® ou por deposição, como é realizado na Makler® e lâmina/lamínula. Gloria et al. (2013) encontrou em seus estudos uma diferença significativa nos parâmetros de motilidade e cinética espermática, para os tipos de preenchimento das câmaras empregadas na avaliação pelo sistema CASA. Obteve melhores resultados para os parâmetros de motilidade (total e progressiva) e cinética (VCL, VAP, VSL) quando foi utilizado o preenchimento por deposição em comparação com preenchimento por capilaridade. Sugere assim que essa diferença pode ser em decorrência de um possível dano aos espermatozoides ao atravessarem o pequeno orifício de abertura da câmara através da ação de capilaridade.

O volume de preenchimento das câmaras é outro fator que tem levantado questionamentos sobre a influência nos resultados de motilidade e cinética espermática, pois existe uma variedade de câmaras comercializadas atualmente com diversos volumes de preenchimentos definidos pelo fabricante. Alguns autores como Palacín et al. (2013) levantaram o questionamento sobre o efeito desses volumes na avaliação da amostra. Para isso avaliaram duas câmaras, Makler® e lâmina/lamínula, com volumes de preenchimento de 5  $\mu\text{L}$  e 10  $\mu\text{L}$  respectivamente. Porém, não obtiveram diferença significativa nos valores de motilidade espermática, somente para os parâmetros de cinética (ALH e BCF) que foi significativo para a lâmina/lamínula com volume de preenchimento de 5  $\mu\text{L}$ .

### 3.2.3 CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA

A concentração espermática é um dos principais parâmetros seminais realizado no procedimento padrão na análise de sêmen. Sendo importante a sua determinação para ser empregada em programas reprodutivos que utilizem a inseminação artificial ou para diagnóstico clínico de infertilidade, pois amostras com essas características de baixo potencial fértil tem sido relacionadas com a baixa concentração de espermatozoides. Portanto, para isso é necessário que a

concentração seja determinada com precisão e confiabilidade (SUKCHAROEN et al., 1994; VERSTEGEN et al., 2002;).

Existem diferentes técnicas e equipamentos que são utilizados para avaliar a concentração espermática. A utilização da câmara de Neubauer é uma técnica recomendada pela World Health Organization “WHO” e apresenta como vantagem o baixo custo, no entanto requer um maior tempo de análise. Uma forma rápida de estimar a concentração espermática é através do espermiométrico e o espectrofotômetro, no entanto tem como desvantagem a contagem de células de descamação, leucócitos e sujidades que podem influenciar na acurácia e precisão dos resultados (VIANNA et al., 2004; SANCHES, 2011).

A concentração espermática também pode ser analisada pelo sistema CASA, porém de forma rápida e simultaneamente com a análise da motilidade. Segundo Verstegen et al. (2002) essa prática não apresenta precisão e pode ser influenciada pelo tipo de câmara utilizada. Essa imprecisão pode ser atribuída as colisões entre os espermatozoides, superestimando a concentração. Uma alternativa para análise do sêmen utilizando o CASA é a realização de uma extensa diluição dessa amostra, obtendo uma concentração final em torno de 20 a 50 milhões de espermatozoides/mL, reduzindo a influência nos resultados de motilidade e cinética espermática.

Estudos realizados com sêmen humano e animal afirmaram que a concentração ideal deve estar entre 20 e 50 x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, para uma avaliação mais eficiente e precisa. Demonstrando assim que o CASA não é eficaz para avaliar a motilidade, cinética e quantidade de espermatozoides/mL de ejaculado de amostras que apresentem alta ou baixa concentração (BUDWORTH et. al., 1987; DAVIS; KATZ, 1993).

Contri et al. (2010) demonstraram que para avaliação de sêmen bovino a concentração ideal para a análise da motilidade e cinética espermática utilizando o CASA é entre 20 e 30 x10<sup>6</sup> espermatozóides/mL. Ao aplicar essa concentração foram identificados valores significativos para as variáveis motilidade total e progressiva e para os parâmetros de cinética espermática (VAP, VCL, ALH, BCF, STR, LIN). Evidenciando que há a necessidade de uma visualização clara e precisa de todos os espermatozoides e a superlotação do campo de amostragem pode gerar uma reconstrução da trajetória incorreta,

devido à detecção errada das cabeças dos espermatozoides por causa das colisões entre células.

Devido a existência de partículas na composição de alguns diluidores de sêmen tem-se empregado o uso de uma ferramenta chamada IDENT presente em alguns sistemas, para melhorar a eficácia na avaliação e reduzir erros devido a presença de *debris*. Esse sistema baseia-se na utilização de sondas fluorescentes (Hoeschst 33342) que se ligam ao DNA dos espermatozoides proporcionando a identificação somente dos espermatozoides que tiveram seu DNA corados com a sonda. Desta forma, somente essas células serão contadas, distinguindo facilmente de outras células presentes na amostra, reduzindo assim os possíveis erros nesse processo (TOMLINSON et al., 2010; ARRUDA et al., 2011).

#### 3.2.4 O DILUIDOR

Os diluidores são usados com a finalidade de proteger a célula espermática durante o processo de resfriamento, congelação e descongelação. Esses diluidores apresentam em sua composição açúcares, tampões, antibióticos e crioprotetores para fornecer nutrição, proteção ao frio, manutenção do pH e osmolaridade (GRAHAM, 1995; OLIVEIRA, 2010).

O CASA apresenta uma limitação para analisar a motilidade e cinética espermática quando utiliza amostras de sêmen com concentração espermática acima de  $50 \times 10^6$  de espermatozoides por mL. Como o sistema não avalia de forma apropriada amostras concentradas, torna-se imprescindível diluir o sêmen antes da avaliação para atingir a concentração ideal de 20 a  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL (VERSTEGEN et al., 2002; CONTRI et al., 2010). O objetivo dessa diluição é promover uma visualização clara de todos os espermatozoides durante a avaliação e obter resultados válidos usando o sistema CASA (FARREL et al., 1996).

Para a diluição do sêmen pós-descongelação tem-se relatado diversas soluções como: salina em tampão fosfato (PBS), de NaCl a 0,9%, Citrato de sódio, TALP, Glicose acrescida de albumina sérica bovina (BSA) e diluidores comerciais de congelação (Bioexcell®), sendo esse empregado em estudos com sêmen de diferentes espécies. Nessa diluição pós-descongelamento o ideal é o

emprego de meios que não afetem as avaliações causando redução na motilidade e cinética espermática (ARRUDA et al., 2011; CONTRI et al., 2010; FARREL et al., 1996).

Os diluidores empregados nesta diluição não devem conter partículas do mesmo tamanho da cabeça do espermatozoide, de forma que o CASA não marque como célula imóvel e subestime o percentual de motilidade (VERSTEGEN, 2002). Isso é muito comum de ocorrer quando diluidores ricos em gema de ovo não clarificada são utilizados. Embora, hoje seja possível utilizar corantes específicos de DNA para minimizar este problema. Entretanto, vale salientar que esse tipo de análise seminal torna-se mais onerosa.

Outro aspecto que tem sido questionado é a utilização de diluidores com osmolaridade diferente do diluidor utilizado na criopreservação. A diluição pós-descongelamento usando soluções isosmótica influenciam negativamente na motilidade espermática, podendo esse fato ser atribuído ao stress osmótico ocasionado pelo aumento da permeabilidade do glicerol e água através da membrana espermática (BALL, 2001; SILVA et al., 2014). Entretanto, Contri et al. (2010) ao avaliarem o efeito do uso de soluções isotônicas na rediluição de sêmen de bovinos para análise da motilidade espermática pelo CASA, não observou a redução da motilidade pelo estresse osmótico. Constatando que a exposição as soluções isosmóticas pareceu não ser prejudicial aos espermatozoides.

### 3.2.5 FREQUÊNCIA DE AQUISIÇÃO DAS IMAGEM

A reconstrução da trajetória do espermatozoide pelo número de quadros e imagens capturadas e a velocidade de aquisição dessas imagens é um outro fator de relevância, que tem influência direta na identificação da motilidade e cinética espermática (MORRIS et al., 1996; MORTIMER, 2000).

A imagem quando analisada para identificar o movimento espermático é realizada através da captura de sucessivas imagens dos espermatozoides. Para que ocorra o movimento espermático é necessário que haja o batimento flagelar propulsionando assim a célula para a frente. Os sistemas de análise de sêmen

computadorizado não possuem a capacidade de capturar a imagem desse flagelo em movimento. Portanto, realizam a captura e avaliação da cinemática da cabeça dos espermatozoides (OWEN; KATZ,1993).

O sistema CASA apresenta diferentes velocidades de aquisição de imagens/segundo em sua configuração. Cada técnico pode ajustar essa configuração de acordo com seu critério de avaliação, sugestão do manual do equipamento ou particularidades da amostra considerada. Estas taxas de aquisição de imagem podem variar entre 25 e 60 Hz nos sistemas comercializados. A trajetória espermática reconstruída com uma velocidade de 30 imagens/segundo pode subestimar o valor real dos parâmetros cinéticos por conseguir avaliar um percurso simples da célula (MORTIMER, 2000; CASTELLINI et al., 2011).

Segundo Owen e Katz (1993), normalmente quando se avalia o movimento do espermatozoide são empregadas taxas de captura de imagem de 25 a 60 Hz em um tempo de 0,5 a 1 segundo. Identificando que essas configurações otimizam a análise, reduzindo o tempo para avaliação e aumentando a qualidade dos resultados.

Nos estudos realizados por Mortimer et al. (1988) foi demonstrado que alguns dos parâmetros utilizados para descrever o movimento dos espermatozoides são altamente influenciados pela frequência de aquisição de imagem empregada.

Morris et al. (1996) ao analisarem amostras de sêmen humano, utilizando uma frequência de 30 Hz, obtiveram valores significativos para os parâmetros de VCL, VAP, LIN, BCF e ALH. Segundo David et al., (1981) e Mortimer e Swan, (1995) para avaliação de parâmetros como ALH e hiperativos é necessário usar uma frequência de 30 a 60 Hz para aquisição de resultados fidedignos. O ALH é um parâmetro importante, pois indica o vigor do batimento flagelar com a frequência da rotação da célula necessária para a progressão dos espermatozoides, sendo considerado um parâmetro que afeta o resultado de fertilização.

As células hiperativas são consideradas como uma subpopulação dentro da amostra e caracteriza-se por movimentos vigorosos, baixa linearidade e progressão e apresenta alta ALH. Para a identificação desses espermatozoides é necessário o uso de frequência de aquisição de 60 Hz (MORRIS et al., 1996)

Devido às diversas opções de configurações oferecidas pelo sistema CASA, há a necessidade de aplicar uma configuração ideal. Para o emprego da configuração adequada é imprescindível avaliar o tipo da amostra que será analisada (sêmen fresco, resfriado ou congelado), pois as configurações empregadas para análise do sêmen fresco não são recomendadas para espermatozoides criopreservados, pois podem apresentar partículas suspensas principalmente em diluidores que apresentam em sua composição gema de ovo (VERSTEGEN et al., 2002).

### **3.3 PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DE SÊMEN COM O CASA.**

Instrumentos de análise computadorizada de sêmen foram desenvolvidos para fornecer um método mais objetivo e reprodutível para análise da motilidade espermática. No entanto, para que o sistema CASA possa contribuir para uma análise com esse padrão é necessário a invariabilidade de protocolos e configurações do sistema (VERSTEGEN et al., 2002; AMAN; KATZ, 2004).

Diferentes equipamentos de análise computadorizadas de sêmen são utilizados em laboratórios de andrologia e centros de pesquisas. Esses equipamentos diferem em grande parte entre máquinas, com base na ótica e software usados para identificar a trajetória do espermatozoide. Além da distinção dos equipamentos entre laboratórios, existe a possibilidade dos técnicos utilizarem uma variedade de metodologias e configurações no sistema CASA para análise do sêmen, proporcionando assim, diversos resultados que não são condizentes ou comparáveis entre laboratórios (AMAN; KATZ, 2004; HOWEGEJIS et al., 2012).

Uma alternativa é a padronização das definições técnicas das configurações do sistema CASA entre laboratórios e centros andrológicos. Verstegen et al. (2002) e Hoogewijs et al. (2011) relataram que é essencial a padronização do sistema utilizando configurações espécie-específica do equipamento no “setup”. Usando essa ferramenta, o técnico pode selecionar a frequência de aquisição de imagens, o tipo de câmara a ser usada, o fator de diluição e parâmetros específicos do sêmen da espécie a ser avaliada. Outra

alternativa é detalhar os parâmetros que foram usados nos estudos na publicação de resultados, possibilitando uma comparação dos dados entre laboratórios de andrologia.

Para avaliação do sêmen pelo CASA é necessário técnicos de laboratório treinados para calibração do sistema e preparação das amostras (VERSTEGEN et al., 2002). BROEKHUIJSE et al. (2011) relatam que para evitar erros na preparação da amostra, é necessário o treinamento de técnicos e o desenvolvimento de um procedimento operacional padrão (POP), proporcionando assim eficiência na preparação das amostras e maior confiabilidade nos resultados do CASA.

Existem vários fatores que influenciam na avaliação da motilidade e cinética espermática pelo sistema CASA, dentre esses estão: a experiência do avaliador, acurácia da câmara utilizada, definições do sistema como identificação das espécies, diluição e diluidores utilizados e frequência de captura de imagem. Devido à presença desses fatores, considerados gargalos para a obtenção de resultados fidedignos, os grupos de pesquisas como ESHRE (Andrologia Special Interest Group) buscam fornecer orientações para solucionar esses entraves e melhorar o desempenho do sistema para avaliação do sêmen.

O ESHRE fornece algumas recomendações para avaliação do sêmen humano, como a velocidade de aquisição de imagem, o tempo de amostragem, a temperatura da amostra no momento da avaliação, a câmara e profundidade. Essas informações são fornecidas com o intuito de promover uma padronização das técnicas e conseqüentemente melhorar os resultados nos laboratórios de andrologia, tornando avaliação espermática pelo CASA mais fidedigna e de alta repetibilidade (ESHRE, 1998; VERSTEGEN et al., 2002; MORTIMER et al., 2015).

#### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no setor de Reprodução Animal do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, durante o ano de 2015 e 2016.

Para os experimentos foram utilizadas amostras de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Machador, previamente congeladas em diluidor BotuCrio®,

(Biotech®, Botucatu, SP) utilizando curva de resfriamento de 0,5°C/min da temperatura ambiente até 5°C, equilíbrio de 30 minutos nesta temperatura e congelação com uma curva de -10°C/min de 5°C até -140°C em máquina TK4000® (TK tecnologia em congelação LTDA, Uberaba-MG). As palhetas de 0,5 mL foram armazenadas por um período mínimo de 04 meses e máximo de 24 meses em botijão criogênico no laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz. O nível de nitrogênio líquido dos botijões foram monitorado semanalmente para não atingir o nível crítico de 15 cm.

Para as avaliações de cinética espermática de cada experimento foram descongeladas duas palhetas de 0,5 mL de sêmen de cada garanhão. As palhetas foram retiradas do botijão criogênico e colocadas em banho-maria a 46° C por 20 segundos para descongelação. Em seguida foram mantidas por no mínimo 5 minutos e máximo de 15 minutos em banho seco a 37°C antes da avaliação da cinética espermática pelo sistema de análise computadorizada de sêmen SCA® (CASA; *Sperm Class Analyzer*®, v.4, Microoptics S.L, Barcelona, Espanha).

Os padrões utilizados para ajuste do equipamento tiveram como base as recomendações do programa *Sperm Class Analyzer*® para análise de sêmen da espécie equina: Particle Area: 4 a 75µm; Slow VCL: 10µm/s; Medium VCL: 45 µm/s; Rapid VCL: 90 µm/s; Progressivity: >70% of STR; Circular: <50%LIN, Conectivity: 12; VAP points: 5; Warning to: 3 fields, 500 sperms, 20% concentration; Imagens per second: 25.

Em cada amostra foram avaliados no mínimo três campos escolhidos aleatoriamente e os parâmetros mensurados foram: Motilidade Total (MT-%), Motilidade Progressiva (MP-%), Velocidade Curvilínea (VCL- µm/s), Velocidade Linear Progressiva (VSL-µm/s), Velocidade Média do Trajeto (VAP-µm/s), percentual de espermatozoides Rápidos, Médios, Lentos, Linearidade (LIN-%), Retilinearidade (STR -%), Index de oscilação (WOB -%), Amplitude do deslocamento Lateral de Cabeça (ALH-µm) e Frequência de Batimento de Cauda (BCF-Hz).

#### 4.1 Experimento 1

#### 4.1.1 Efeito da velocidade de captura de 25 imagens/segundo na cinética espermática.

Foram descongeladas 44 palhetas de sêmen, duas de cada garanhão, para testar o efeito do número de imagens capturadas de acordo com a velocidade de captura dessas imagens/segundo na cinética espermática. As amostras descongeladas permaneceram incubadas em banho seco a 37°C por no mínimo 5 minutos e no máximo 15 minutos. Antes da avaliação foi realizada a diluição utilizando diluidor comercial BotuCrio® para obter uma concentração final de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Foi retirado uma alíquota de 5 µl da amostra e depositado em lâmina sob lamínula. Foram avaliados os seguintes tratamentos: 25/25Hz (25 imagens capturadas por segundo com uma velocidade de 25Hz), 25/30Hz e 25/50Hz. Uma rotação aleatória entre as velocidades de captura de imagens testadas foi realizada para evitar qualquer efeito de tempo de incubação.

## 4.2 Experimento 2

#### 4.2.1 Efeito dos tipos de câmaras na cinética espermática.

Foram descongeladas 28 palhetas, duas de cada garanhão, para testar o efeito da influência da câmara utilizada no sistema CASA na cinética espermática. As amostras descongeladas permaneceram incubadas em banho seco a 37°C por no mínimo 5 minutos e no máximo 15 minutos. Antes da avaliação foram diluídas em BotuCrio® para uma concentração final de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

Foram avaliadas as seguintes câmaras: Lâmina sob lamínula, Leja 10µm e Leja 20µm e. Para o preenchimento das câmaras com o sêmen descongelado foi utilizado um volume de 2 µL, 6 µL e 5µL, para a Leja 10µm, Leja 20µm e lâmina sob lamínula, respectivamente. Todas as lâminas foram preenchidas de acordo as recomendações do fabricante. Uma rotação aleatória foi feita com as diferentes câmaras testadas para evitar qualquer efeito de tempo de incubação. Após a preparação, cada lâmina foi deixada em repouso por 30 segundos a uma temperatura de 37°C para evitar movimento do fluido na câmara.

As definições das configurações para o software SCA®, foi regulado para capturar 25 imagens/segundo com a velocidade de captura de 30 e 50 Hz.

### 4.3 Experimento 3

#### 4.3.1 Efeito da taxa de diluição na cinética espermática.

Foram descongeladas 44 palhetas, duas de cada garanhão, para testar o efeito da taxa de diluição na cinética espermática. As amostras descongeladas permaneceram incubadas em banho seco a 37°C por no mínimo 5 minutos e no máximo 15 minutos. Para a diluição destas amostras antes da avaliação da cinética espermática foi utilizado o diluidor BotuCrio®. Foram avaliadas as seguintes taxas de diluição  $25 \times 10^6$ ,  $50 \times 10^6$  e  $100 \times 10^6$  de espermatozoides/mL. O sistema foi regulado para capturar 25 imagens/segundo com a velocidade de captura de 50 Hz e foi depositado 5  $\mu$ l da amostra em lâmina sob lamínula. Uma rotação aleatória foi feita com as diferentes diluições testadas para evitar qualquer efeito de tempo de incubação.

### 4.4 Experimento 4

#### 4.4.1 Efeito dos diluidores utilizados na rediluição na cinética espermática.

Foram descongeladas 44 palhetas, duas de cada garanhão, para testar o efeito dos diluidores para tornar a amostra mais diluída de forma a auxiliar na avaliação apropriada da cinética espermática. As amostras descongeladas permaneceram incubadas em banho seco a 37°C por no mínimo 5 minutos e no máximo 15 minutos. As amostras foram diluídas nos diferentes diluidores para a concentração final de 25 e 50  $\times 10^6$  de espermatozoides/mL definida no Experimento 3. Foram avaliados os seguintes diluidores: BotuCrio®, BotuSêmen®, TALP *sperm*, Solução fisiológica. O sistema foi regulado para capturar 25 imagens/segundo com a velocidade de captura de 50 Hz e foi depositado 5  $\mu$ l da amostra em lâmina sob lamínula (22 mm x 22 mm). Uma rotação aleatória foi feita com os diferentes diluidores testados na rediluição para evitar qualquer efeito de tempo de incubação.

## 4.5 Análises Estatísticas

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em que os ganhões foram considerados como bloco.

Foi utilizado uma análise de variância para testar as diferenças entre os tratamentos. Todos os pressupostos foram testados e quando violados foi utilizado a transformação boxcox por meio da função “boxcox” do pacote MASS versão 7.3-41 (VENABLES; RIPLEY, 2002).

Todos os dados de cinética gerados pelo CASA em todos os experimentos foram salvos na base de dados do sistema e registrados em planilhas de Excel e submetidas a análise estatística com o auxílio do R Core Team (R *Foudation for Statistical Computing, Atria, 2015*).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Experimento 1

Neste estudo a cinética espermática não foi afetada pelas diferentes velocidades de captura de 25 imagens/segundo ( $P > 0,05$ ), como apresentado na (Tabela 1).

**Tabela 1 - Média e desvio padrão da cinética dos espermatozoides equino criopreservados avaliados nas diferentes velocidades de captura de imagem (25/25 Hz, 25/30 Hz, 25/50 Hz) pelo SCA® (CASA).**

Parâmetros	Velocidade de captura de 25 imagens		
	25 Hz	30 Hz	50 Hz
MT (%)	45,0 ± 20,0	44,0 ± 20,7	44,3 ± 15,5
MP (%)	21,4 ± 13,9	21,8 ± 13,9	20,0 ± 11,4
Rápido (%)	8,8 ± 9,5	8,9 ± 9,0	7,7 ± 7,8
Médio (%)	14,7 ± 9,8	15,2 ± 10,7	13,7 ± 7,8
Lento (%)	21,0 ± 7,2	20,1 ± 7,1	20,8 ± 6,1
VCL (µm/s)	51,4 ± 11,7	53,5 ± 13,1	50,5 ± 10,9
VSL (µm/s)	27,6 ± 8,8	28,5 ± 8,7	27,4 ± 8,5

VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	$32,7 \pm 9,0$	$33,0 \pm 9,6$	$32,4 \pm 8,8$
LIN (%)	$53,3 \pm 11,8$	$52,4 \pm 12,6$	$54,0 \pm 12,0$
STR (%)	$83,4 \pm 6,3$	$83,2 \pm 6,6$	$83,7 \pm 6,1$
WOB (%)	$63,3 \pm 10,2$	$62,9 \pm 10,0$	$63,9 \pm 10,3$
ALH ( $\mu\text{m}$ )	$2,4 \pm 0,3$	$2,4 \pm 2,4$	$2,3 \pm 0,3$
BCF (Hz)	$15,9 \pm 4,4$	$15,8 \pm 4,4$	$15,4 \pm 4,9$
HIPERATIVO (%)	$6,8 \pm 5,9$	$7,3 \pm 6,1$	$5,9 \pm 4,7$

Motilidade Total (MT-%), Motilidade Progressiva (MP-%), Rápidos (%), Médios (%), Lentos (%), Velocidade Curvilínea (VCL-  $\mu\text{m/s}$ ), Velocidade Linear Progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$ ), Velocidade Média do Trajeto (VAP- $\mu\text{m/s}$ ), Linearidade (LIN-%), Retilinearidade (STR-%), Índice de Oscilação (WOB-%), Amplitude do Deslocamento Lateral de Cabeça (ALH- $\mu\text{m}$ ), Frequência de Batimento de Cauda (BCF-Hz) e Hiperativos (%). Não houve diferença entre as médias ( $P > 0,05$ ).

## 5.2 Experimento 2

A câmara utilizada no CASA (SCA®) para avaliação da cinética espermática influenciou apenas os parâmetros de MP, Médios, Lentos, VSL, LIN, STR, WOB e Hiperativos ( $P < 0,05$ ), conforme Tabela 2. Para os parâmetros espermáticos MT, Rápidos, VCL, VAP, ALH, BCF não houve diferença ( $P > 0,05$ ), entre as câmaras testadas.

O uso de lâmina sob lamínula resultou em melhores resultados cinéticos de MP, Médios, VSL do que a Leja® 20 $\mu\text{m}$  ( $P < 0,05$ ), mas foi semelhante a Leja® 10 $\mu\text{m}$  para os parâmetros MP, Médios, VSL, Hiperativos ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 2 - Média e desvio padrão da cinética dos espermatozoides equino criopreservados avaliados em diferentes câmaras pelo SCA® (CASA) com velocidade de 50 Hz de captura de 25 imagens/segundo.**

Parâmetros	Lâmina/lamínula	Leja® 10 $\mu\text{m}$	Leja® 20 $\mu\text{m}$
MT (%)	$32,0 \pm 19,4$	$28,9 \pm 11,4$	$29,8 \pm 14,9$
MP (%)	$11,7 \pm 11,5^a$	$9,9 \pm 5,8^a$	$8,4 \pm 6,0^b$
Rápido (%)	$4,8 \pm 7,3$	$4,8 \pm 4,5$	$3,7 \pm 4,1$
Médio (%)	$8,9 \pm 7,4^a$	$7,4 \pm 4,0^{ab}$	$6,7 \pm 3,8^b$
Lento (%)	$18,2 \pm 8,4^a$	$16,6 \pm 7,1^b$	$19,4 \pm 8,7^a$

VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	42,8 $\pm$ 12,5	46,8 $\pm$ 10,4	39,2 $\pm$ 10,0
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	19,8 $\pm$ 7,2 <sup>a</sup>	19,8 $\pm$ 7,9 <sup>a</sup>	16,2 $\pm$ 6,1 <sup>b</sup>
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	26,1 $\pm$ 10,1	24,2 $\pm$ 7,1	21,8 $\pm$ 8,9
LIN (%)	45,4 $\pm$ 9,1 <sup>a</sup>	41,4 $\pm$ 9,2 <sup>b</sup>	40,5 $\pm$ 8,3 <sup>b</sup>
STR (%)	78,4 $\pm$ 7,9 <sup>a</sup>	74,0 $\pm$ 10,2 <sup>b</sup>	76,2 $\pm$ 7,8 <sup>a</sup>
WOB (%)	57,7 $\pm$ 6,7	54,5 $\pm$ 5,8	52,7 $\pm$ 6,0
ALH ( $\mu\text{m}$ )	2,2 $\pm$ 0,3	2,21 $\pm$ 0,3	2,32 $\pm$ 0,3
BCF (Hz)	16,7 $\pm$ 3,8	16,2 $\pm$ 4,4	16,0 $\pm$ 3,4
HIPERATIVO (%)	3,2 $\pm$ 4,4 <sup>a</sup>	3,0 $\pm$ 2,6 <sup>ab</sup>	2,2 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>

Motilidade Total (MT-%), Motilidade Progressiva (MP-%), Rápidos (%), Médios (%), Lentos (%), Velocidade Curvilínea (VCL-  $\mu\text{m/s}$ ), Velocidade Linear Progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$ ), Velocidade Média do Trajeto (VAP- $\mu\text{m/s}$ ), Linearidade (LIN-%), Retilinearidade (STR -%), Index de Oscilação (WOB -%), Amplitude do Deslocamento Lateral de Cabeça (ALH- $\mu\text{m}$ ), Frequência de Batimento de Cauda (BCF-Hz) e Hiperativos (%). Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### 5.3 Experimento 3

A concentração espermática influenciou apenas os resultados de MT, MP, Médios, Lentos, LIN, STR e BCF ( $P < 0,05$ ). A concentração espermática de 25 e 50  $\times 10^6/\text{mL}$  resultou em menor percentual de MT, Médios e Lentos quando comparado a 100  $\times 10^6/\text{mL}$  ( $P < 0,05$ ). A concentração espermática de 100  $\times 10^6/\text{mL}$  resultou em maior percentual de MP comparado a 50  $\times 10^6/\text{mL}$  ( $P < 0,05$ ). A concentração espermática de 25 e 50  $\times 10^6/\text{mL}$  resultou em maior LIN, STR e BCF do que 100  $\times 10^6/\text{mL}$  ( $P < 0,05$ ; Tabela 3).

**Tabela 3- Média e desvio padrão da cinética dos espermatozoides equino criopreservados avaliados nas diferentes concentrações espermáticas de 25, 50 e 100 $\times 10^6/\text{mL}$  pelo SCA® (CASA).**

Parâmetros	Concentração Espermática		
	25 $\times 10^6/\text{mL}$	50 $\times 10^6/\text{mL}$	100 $\times 10^6/\text{mL}$
MT (%)	49,2 $\pm$ 18,7 <sup>b</sup>	52,1 $\pm$ 20,5 <sup>b</sup>	65,6 $\pm$ 23,5 <sup>a</sup>
MP (%)	17,7 $\pm$ 13,0 <sup>ab</sup>	18,1 $\pm$ 14,2 <sup>b</sup>	22,4 $\pm$ 17,8 <sup>a</sup>
Rápido (%)	12,4 $\pm$ 11,0	13,3 $\pm$ 12,6	16,9 $\pm$ 16,2
Médio (%)	9,2 $\pm$ 7,6 <sup>b</sup>	9,4 $\pm$ 5,8 <sup>b</sup>	14,1 $\pm$ 8,7 <sup>a</sup>

Lento (%)	27,5 ± 7,6 <sup>b</sup>	29,4 ± 7,0 <sup>b</sup>	34,5 ± 9,2 <sup>a</sup>
VCL (µm/s)	51,0±17,7	50,4 ± 18,6	52,9 ± 21,7
VSL (µm/s)	19,5 ± 9,0	18,9 ± 9,4	18,8 ± 9,8
VAP (µm/s)	25,9 ± 10,0	25,6 ± 10,7	26,9 ± 12,2
LIN (%)	36,7 ± 6,2 <sup>a</sup>	35,6 ± 6,8 <sup>a</sup>	33,9 ± 6,0 <sup>b</sup>
STR (%)	72,7 ± 8,2 <sup>a</sup>	71,0 ± 9,3 <sup>a</sup>	67,5 ± 8,9 <sup>b</sup>
WOB (%)	50,1 ± 3,8	49,8 ± 4,0	49,9 ± 3,2
ALH (µm)	2,3 ± 0,5	2,2 ± 0,6	2,3 ± 0,5
BCF (Hz)	20,5 ± 4,4 <sup>a</sup>	20,3 ± 5,0 <sup>a</sup>	19,1 ± 4,7 <sup>b</sup>
HIPERATIVO (%)	4,5 ± 5,1	4,7 ± 5,3	5,0 ± 5,5

Motilidade Total (MT-%), Motilidade Progressiva (MP-%), Rápidos (%), Médios (%), Lentos (%), Velocidade Curvilínea (VCL- µm/s), Velocidade Linear Progressiva (VSL-µm/s), Velocidade Média do Trajeto (VAP-µm/s), Linearidade (LIN-%), Retilinearidade (STR -%), Index de Oscilação (WOB -%), Amplitude do Deslocamento Lateral de Cabeça (ALH-µm), Frequência de Batimento de Cauda (BCF-Hz) e Hiperativos (%). Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey (P < 0,05).

#### 5.4 Experimento 4

Os diluidores influenciaram significativamente os parâmetros de MT, MP, Rápidos, Médios, VCL, STR, ALH, BCF e Hiperativos independente da concentração empregada (P < 0,10). A MT foi maior para os espermatozoides diluído em BotuCrio®, TALP *sperm* e Solução fisiológica (P > 0,10) e esta motilidade foi significativamente superior nas amostras diluídas em BotuCrio® quando comparada ao BotuSêmen® (P < 0,10). O uso do diluidor BotuCrio® resultou em maior percentual de MP, Médios, STR e Hiperativos e maior frequência de BCF (P < 0,10) quando comparado aos demais diluidores testados. O emprego dos diluidores BotuCrio® e TALP *sperm* resultou em maior VCL e Rápidos comparado ao BotuSêmen® (P < 0,10) e para os espermatozoides Rápidos também foi superior a Solução fisiológica (P < 0,10). Os espermatozoides apresentaram maior ALH quando diluídos em BotuCrio® e Solução fisiológica do que em BotuSêmen® e TALP *sperm* (P < 0,10; Tabela 4).

Os parâmetros cinéticos MT, MP, Rápidos, Médios, Lentos, VCL, ALH e Hiperativos foram maiores quando as amostras estavam diluídas para 50 x10<sup>6</sup>

espermatozoides/mL do que  $25 \times 10^6$  espermatozoides /mL independente do diluidor utilizado ( $P < 0,10$ ; Tabela 4).

Houve interação significativa entre diluidor e concentração espermática para os parâmetros de VSL, VAP, LIN e WOB. Para os parâmetros cinéticos de VSL, VAP e LIN a interação entre diluidor e concentração espermática só foi encontrada quando a amostra foi diluída para  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Nesta concentração, vale ressaltar a superioridade do BotuCrio® e TALP *sperm* quando comparado ao BotuSêmen® para preservar a VSL ( $P < 0,10$ ), a superioridade dos mesmos diluidores quando comparado ao BotuSêmen® e Solução fisiológica para preservar VAP ( $P < 0,10$ ) e a superioridade destes comparado a Solução fisiológica para preservar a LIN. Na concentração espermática de  $25 \times 10^6$  /mL, o emprego de TALP *sperm* resultou em maior percentual de WOB quando comparado aos demais diluidores ( $P < 0,10$ ). Entretanto, na concentração espermática de  $50 \times 10^6$  /mL o uso de TALP *sperm* foi melhor do que BotuCrio® e Solução fisiológica ( $P < 0,10$ ; Tabela 4).

Percebe-se interação significativa entre concentração espermática e diluidor principalmente quando as amostras foram diluídas em Solução fisiológica. Com o emprego deste, a VSL, a VAP e a LIN foram superiores nas amostras contendo  $50 \times 10^6$  de espermatozoides/mL quando comparado com  $25 \times 10^6$  /mL ( $P < 0,10$ ; Tabela 4).

**Tabela 4 - Média da cinética dos espermatozoides equino criopreservados avaliados pelo SCA® (CASA) utilizando diferentes diluidores (BotuCrio®, BotuSêmen®, TALP *sperm* e Solução fisiológica) e concentrações espermáticas ( $25$  e  $50 \times 10^6$  /mL).**

Parâmetros	Conc.	Diluidores				
		BotuCrio®	BotuSêmen®	TALP	SolFi	M.G
MT (%)	25	23,6	19,0	20,9	20,5	21,0 <sup>B</sup>
	50	30,4	28,4	32,4	29,8	30,3 <sup>A</sup>
	M.G	27,0 <sup>a</sup>	23,7 <sup>b</sup>	26,7 <sup>ab</sup>	25,2 <sup>ab</sup>	
MP (%)	25	8,2	5,5	5,6	4,9	6,1 <sup>B</sup>
	50	9,7	7,8	9,4	8,7	8,9 <sup>A</sup>
	M.G	8,9 <sup>a</sup>	6,7 <sup>b</sup>	7,5 <sup>b</sup>	6,8 <sup>b</sup>	
Rápido (%)	25	2,5	1,8	2,4	1,8	4,3 <sup>A</sup>
	50	2,6	2,3	3,8	3,0	2,9 <sup>B</sup>

	M.G	2,6 <sup>ab</sup>	2,0 <sup>c</sup>	3,1 <sup>a</sup>	2,4 <sup>bc</sup>	
Médio (%)	25	6,4	4,1	3,9	4,2	4,7 <sup>B</sup>
	50	8,5	6,3	6,9	7,6	7,3 <sup>A</sup>
	M.G	7,5 <sup>a</sup>	5,2 <sup>b</sup>	5,4 <sup>b</sup>	5,9 <sup>b</sup>	
Lento (%)	25	14,8	13,1	14,4	14,9	14,3 <sup>B</sup>
	50	19,8	19,8	21,2	20,1	20,2 <sup>A</sup>
	M.G	17,3	16,5	17,8	17,5	
VCL(μm/s)	25	37,9	32,9	35,6	32,0	34,6 <sup>B</sup>
	50	37,2	34,0	36,6	35,7	35,9 <sup>A</sup>
	M.G	37,6 <sup>a</sup>	33,5 <sup>c</sup>	36,1 <sup>ab</sup>	33,9 <sup>bc</sup>	
VSL(μm/s)	25	21,2 <sup>a</sup>	18,1 <sup>bc</sup>	19,5 <sup>ab</sup>	15,6 <sup>cB</sup>	18,6
	50	20,1 <sup>a</sup>	19,3 <sup>a</sup>	19,0 <sup>a</sup>	20,5 <sup>aA</sup>	19,7
	M.G	20,6	18,7	19,3	18,1	
VAP(μm/s)	25	25,2 <sup>a</sup>	21,8 <sup>b</sup>	25,4 <sup>a</sup>	19,6 <sup>bB</sup>	23,0
	50	24,5 <sup>a</sup>	23,6 <sup>a</sup>	26,1 <sup>a</sup>	23,5 <sup>aA</sup>	24,4
	M.G	24,9	22,7	25,8	21,6	
LIN (%)	25	54,6 <sup>a</sup>	51,0 <sup>ab</sup>	53,8 <sup>a</sup>	47,1 <sup>bB</sup>	51,6
	50	52,7 <sup>a</sup>	54,0 <sup>a</sup>	54,4 <sup>a</sup>	51,1 <sup>aA</sup>	53,1
	M.G	53,7	52,5	54,1	49,1	
STR (%)	25	82,7	78,9	76,2	77,5	78,8
	50	80,4	79,4	77,7	78,5	79,0
	M.G	81,5 <sup>a</sup>	79,2 <sup>b</sup>	76,9 <sup>c</sup>	78,0 <sup>bc</sup>	
WOB (%)	25	65,8 <sup>b</sup>	63,6 <sup>bB</sup>	70,1 <sup>aA</sup>	60,1 <sup>cB</sup>	64,9
	50	65,3 <sup>b</sup>	67,5 <sup>abA</sup>	69,7 <sup>aA</sup>	64,3 <sup>bA</sup>	66,2
	M.G	65,6	65,6	69,9	62,2	
ALH (μm)	25	2,5	2,2	2,1	2,3	2,3 <sup>B</sup>
	50	2,5	2,3	2,3	2,3	2,4 <sup>A</sup>
	M.G	2,5 <sup>a</sup>	2,2 <sup>b</sup>	2,2 <sup>b</sup>	2,3 <sup>a</sup>	
BCF (Hz)	25	10,8	9,2	8,1	8,6	9,2
	50	10,9	9,6	8,8	9,7	9,7
	M.G	10,8 <sup>a</sup>	9,4 <sup>b</sup>	8,5 <sup>c</sup>	9,2 <sup>b</sup>	
HIP (%)	25	3,7	2,3	1,8	2,3	2,5 <sup>B</sup>
	50	4,1	2,6	2,8	3,7	3,3 <sup>A</sup>

M.G	3,9 <sup>a</sup>	2,5 <sup>b</sup>	2,3 <sup>b</sup>	3,0 <sup>b</sup>
-----	------------------	------------------	------------------	------------------

Motilidade Total (MT-%), Motilidade Progressiva (MP-%), Rápidos (%), Médios (%), Lentos (%), Velocidade Curvilínea (VCL-  $\mu\text{m/s}$ ), Velocidade Linear Progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$ ), Velocidade Média do Trajeto (VAP- $\mu\text{m/s}$ ), Linearidade (LIN-%), Retilinearidade (STR -%), Index de Oscilação (WOB -%), Amplitude do Deslocamento Lateral de Cabeça (ALH- $\mu\text{m}$ ), Frequência de Batimento de Cauda (BCF-Hz) e Hiperativos (HIP- %), Concentração espermática (Conc); Solução fisiológica (SolFi), TALP *sperm* (TALP); Média geral (MG). Médias seguidas de letras minúsculas sobreescritas na linha e maiúsculas sobreescritas na coluna distintas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P < 0,10).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Experimento 1

O número de imagens capturadas por segundo e a velocidade de captura das mesmas é um fator importante para a reconstrução da trajetória real do espermatozoide. Portanto, quanto maior for o número de imagens capturadas e menor o intervalo entre essas imagens, maiores serão as informações correspondente a trajetória espermática, afetando assim os resultados de cinética obtidos pelo CASA (KRAEMER et al., 1998; MORTIMER, 2000).

Ainda não existe uma padronização com relação ao número de imagens capturadas por segundo e a velocidade de captura dessas imagens entre os diferentes sistemas de análise computadorizada de sêmen e entre os diferentes laboratórios de andrologia e tecnologia de sêmen (MORRIS et al.; 1996; VERSTEGEN et al.; 2002; HOOGEWIJS et al., 2012).

A velocidade de captura de 25 imagens/segundo não influenciou a cinética espermática avaliada pelo SCA® (P>0,05). Muito provavelmente porque a BCF das amostras analisadas eram inferiores a 25 Hz (15,9  $\pm$  4,4; 15,8  $\pm$  4,4; 15,4  $\pm$  4,9) (KATZ et al., 1985; CASTELLINI et al., 2011). Por isso a velocidade mínima de captura de 25 Hz foi suficiente para realizar a reconstrução da trajetória espermática.

Percebe-se que quanto maior são os parâmetros cinéticos dos espermatozoides (VCL, VSL, VAP e BCF) maior é a necessidade de utilizar uma

velocidade de captura de imagens/segundo acima de 60 Hz (MORRIS, et al., 1996; RIJSSELAERE et al., 2003). De acordo com Mortimer et al. (1988), o sêmen humano fresco com boa viabilidade necessita de velocidade acima de 50 Hz.

Os resultados obtidos nesse experimento diferem dos relatados na literatura. Rijsselaere et al. (2003) encontraram diferença entre as velocidades de captura de imagens testadas com superioridade para 60 Hz. É importante salientar que os autores trabalharam com sêmen de cão fresco diluído que apresenta normalmente boa qualidade espermática comparada a espécies como equino e suíno. Tais resultados podem ser atribuídos ao tipo de amostra (fresca) e a qualidade do sêmen. É sabido que a espécie canina apresenta boa qualidade espermática comparada a outras espécies, com bom resultado de motilidade espermática (WATSON; PLUMMER, 1985). Vale ressaltar que o sêmen canino fresco não pode ser comparado ao sêmen equino, principalmente de garanhões da raça Mangalarga Machador, considerados de baixa congelabilidade, pois apresentam baixa motilidade espermática pós descongelação, sendo considerados “maus” congeladores (ALVARENGA et al., 2005).

Devido aos resultados obtidos neste estudo não foi possível definir uma taxa de aquisição de imagem adequada para avaliação do sêmen equino criopreservado. Entretanto, com base nos dados encontrados na literatura decidimos para os próximos experimentos utilizar uma velocidade de aquisição de 25 imagens/segundo de 50 Hz, garantindo uma adequada avaliação da trajetória espermática.

## **6.2 Experimento 2**

A avaliação da motilidade espermática é considerada como um parâmetro importante para estimar o potencial fértil de uma amostra de sêmen. A introdução do sistema CASA na avaliação de sêmen tem permitido a realização de uma avaliação com maior objetividade, embora alguns fatores, como a câmara para análise de sêmen possa interferir nos resultados (VERSTEGEN et al., 2002). Neste estudo, comparamos o efeito de três câmaras

(lâmina sob lamínula, Leja® 10 µm, Leja® 20 µm) sobre os parâmetros de cinética espermática de amostras de sêmen equino criopreservado.

Nota-se que não houve influência do tipo de câmara utilizada nos parâmetros de MT, VCL, VAP, ALH e BCF de espermatozoides equino criopreservados analisados pelo SCA®. Embora, as câmaras utilizadas apresentavam características distintas como profundidade (10 a 20 µm), volume de preenchimento (5, 2 e 6 µL), método de preenchimento por (deposição ou capilaridade) e design (câmara aberta e fechada). Esses resultados contradizem o que era esperado baseado na literatura da área que registra diferença significativa para os parâmetros cinéticos entre Leja®, Cellvu®, Makler®, ISAS® e lâmina sob lamínula (HOOGEWIJS et al., 2012; GLORIA et al., 2013). Dos parâmetros citados acima Contri et al. (2010) não encontraram diferença significativa para VAP comparando Makler® e lâmina sob lamínula.

O parâmetro de cinética ALH obtido nesse experimento poderia ter apresentado diferença significativa devido as diferentes profundidades das câmaras (lâmina sob lamínula, Leja® 10 µm, Leja® 20 µm) utilizadas para análise do sêmen. Este fato é difícil de ser explicado, devido não haver uma justificativa plausível ou estudos que tenham encontrado resultados semelhantes. Segundo Le Lannou et al. (1992) e Kraemer (1998), a câmara que apresenta profundidade de 20 µm ou maior é indicada para avaliação dos parâmetros de movimento espermático como ALH e Hiperativos. Portanto, câmaras que apresentam profundidade inferior a 20 µm restringe a amplitude do movimento dos espermatozoides.

O tipo de câmara influenciou na MP, VSL, LIN, STR, WOB e Hiperativos. Conforme relatado na literatura (VERSTEGEN et al., 2002; PALACÍN et al., 2013) essa influência pode ser atribuída a profundidade da câmara, decorrente da restrição do deslocamento espermático pela interação dos mesmos a parede da câmara ou por erros na captura das imagens promovidos por diferentes planos focais, principalmente quando da utilização de câmara com profundidade maior que 20 µm. Segundo Palacín et al. (2013), o preenchimento da lâmina sob lamínula com volume de sêmen de 5µL resulta em uma profundidade de aproximadamente 10 µm, essa proximidade dos espermatozoides com a parede

da câmara impulsiona esta célula, promovendo maior propulsão espermática. É importante ressaltar que esta propulsão influi na cinética, não sendo este um resultado fidedigno do movimento próprio do espermatozoide (LE LANNOU et al., 1992).

A forma de preenchimento da câmara também influencia os resultados obtidos pelo SCA®. As câmaras Lejas® utilizadas apresentam forma de preenchimento por capilaridade e esse procedimento de preenchimento influencia nos resultados de cinética espermática. Este fato é atribuído ao fluxo do espermatozoide pelo orifício de abertura da câmara através da ação de capilaridade, podendo danificar o espermatozoide resultando em redução da motilidade espermática. Portanto, pode explicar os melhores resultados utilizando lâmina e lamínula que apresenta método de preenchimento com deposição da amostra em lâmina sob lamínula (GLORIA et al., 2013; LENZ et al., 2011).

O uso das câmaras Leja10® e Leja20® resultaram em redução de MP, VSL, LIN, STR e Hiperativos. Por mais que este tipo de câmara seja indicada para avaliação espermática pelo SCA® não encontramos benefícios em seu uso devido ao custo elevado, danos espermáticos devido ao efeito da capilaridade no preenchimento e ação tóxica atribuída a cola e tintas utilizada na fabricação das mesmas, resultando em redução na motilidade espermática (GLORIA et al., 2013).

Não foi encontrado diferença entre as câmaras testadas para o parâmetro VCL que representa a trajetória real dos espermatozoides, portanto, a lâmina sob lamínula pode ser considerada uma ótima opção de uso no SCA®. Além disso, apresenta a vantagem do baixo custo, fácil manuseio com economia de tempo durante as análises e são descartáveis, evitando contaminação ou influência devido a lavagem e reutilização.

### **6.3 Experimento 3**

A concentração espermática adequada é necessária para a obtenção de uma análise bem sucedida do movimento e velocidade dos espermatozoides

com o emprego do CASA. Por isso, foi avaliado o efeito de 25, 50 e 100 x10<sup>6</sup> de espermatozoides/mL sobre os parâmetros de cinética no sêmen equino criopreservado.

Nota-se que houve maior percentual de MT, Médios e Lentos quando utilizada a concentração espermática de 100 x10<sup>6</sup> /mL (P < 0,05). Esse resultado era esperado porque uma grande quantidade de espermatozoides por campo faz com que ocorra colisão entre as células gerando movimento das que estavam estáticas ou alterando o tipo de movimento celular, o que resulta em erro de leitura do sistema. Quando o sêmen está pouco diluído e, por isso, muito concentrado, o batimento do flagelo do espermatozoide rápido irá desencadear pequenos movimentos naqueles imóveis que acabam sendo considerado lento pelo sistema (CONTRI et al., 2010). Além disso, os espermatozoides podem ser avaliados em diferentes campos focais e o sistema fazer a leitura do mesmo espermatozoide mais de uma vez, gerando um maior percentual de espermatozoides móveis e lentos. Por isso, constatamos que o emprego da concentração espermática de 100 x10<sup>6</sup> /mL ou acima não gera resultados confiáveis e fidedignos, ratificando os resultados obtidos por Verstegen et al. (2002), Rijsselaere et al. (2003) e Contri et al. (2010). Esses autores atribuem os erros de análise ao número elevado de espermatozoides no campo de captura da imagem e também ao problema da não identificação do real padrão do movimento em rápido, médio e lento que influencia na análise da motilidade total pelo CASA.

Os melhores resultados encontrados com o emprego das concentrações espermática de 25 e 50 x10<sup>6</sup> /mL são atribuídos concentração espermática de 25 e 50 x10<sup>6</sup> /mL influenciou os parâmetros LIN, STR, BCF (P < 0,05). O uso de uma menor quantidade de espermatozoides no campo de captura reduz a ocorrência de colisões entre as células e conseqüentemente melhora alguns parâmetros de cinética espermática como LIN, STR e BCF (FARREL, et al., 1996; CONTRI, et al.; 2010). Contri et al. (2010) obtiveram melhores resultados de movimento espermático quando empregaram 30 x10<sup>6</sup> de espermatozoides/mL, entretanto quando usaram concentrações mais elevadas perceberam um declínio na LIN, STR e BCF.

Registra-se superioridade significativa com uso de diluição que resulte em 25 e 50 x10<sup>6</sup> de espermatozoides/mL nas avaliações de alguns parâmetros de cinética pelo SCA®. Estudos realizados com diferentes espécies: humana, equina, bovina e coelho obtiveram melhores resultados utilizando amostras de sêmen com concentração entre 25 e 50 x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL (FARREL et al., 1996; CONTRI et al., 2010; HOOGEWIJS et al., 2012). Por isso, no último experimento, testamos o uso de diferentes diluidores para atingir a concentração de 25 e 50 x10<sup>6</sup> de espermatozoides/mL na tentativa de evitar colisões das células e erros na aquisição de imagem.

#### 6.4 Experimento 4

A diluição do sêmen é um procedimento fundamental para auxiliar na avaliação e obtenção de resultados fidedignos utilizando o SCA®. Esse procedimento é necessário devido as limitações que o CASA apresenta para avaliação de amostras com concentrações elevadas. Portanto, é essencial a diluição das amostras de sêmen com o objetivo de promover uma visualização clara dos espermatozoides no momento da análise (FARREL et al., 1996; CONTRI et al., 2010). Neste estudo verificamos o efeito dos diluidores BotuCrio®, BotuSêmen®, TALP *sperm* e Solução fisiológica sob a cinética espermática de amostras de sêmen equino criopreservadas avaliadas pelo SCA®.

O BotuCrio® foi melhor que os demais diluidores quando avaliado os parâmetros de MP, Médios, STR, BCF e Hiperativos. Esses resultados satisfatórios podem ser atribuídos ao emprego deste durante o processo de congelação. Nota-se que a utilização do diluidor BotuCrio® na rediluição da amostra de sêmen pós-descongelação evitou a ocorrência do stress osmótico e iônico em virtude de ter preservado o mesmo ambiente extracelular e os espermatozoides não terem que se adaptar a um novo meio com composição, osmolaridade e pH diferentes.

Recomenda-se o emprego do mesmo diluidor utilizado durante a congelação para o ajuste da concentração espermática ideal para avaliação da cinética espermática pelo SCA®. Quando o diluidor utilizado para a congelação de sêmen equino não é informado, o segundo diluidor de escolha seria o TALP

*sperm*. O diluidor TALP *sperm* preservou de maneira semelhante ao BotuCrio® os parâmetros cinéticos: MT; Rápidos e VCL independente da concentração utilizada durante análise pelo SCA®. E, os parâmetros cinéticos VSL, VAP e LIN foram superiores nas amostras diluídas para  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL em BotuCrio® e TALP *sperm* quando comparado com a rediluição usando BotuSêmen®, Solução Fisiológica ou ambos. Vale ressaltar a superioridade do TALP *sperm* quando comparado aos demais diluidores para preservar o WOB quando a rediluição foi para atingir  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Quando a rediluição foi para atingir  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL, o TALP *sperm* mostrou ser melhor do que o uso de BotuCrio® e Solução fisiológica.

Acredita-se que essa superioridade em preservar determinadas características cinéticas seja em razão das substâncias que compõe o TALP *sperm*, sendo uma dessas o piruvato que é considerado um excelente substrato energético, promovendo melhoria na motilidade espermática (UPRETI et al., 1998). Apesar dos aspectos positivos, o TALP *sperm* é um diluidor complexo para preparar, necessita de ajustes de pH, muitos reagentes entram na sua formulação, requer filtração e tem custo elevado. Além disso, no decorrer do tempo de análise, foi possível perceber a formação de debris que comprometiam o movimento espermático e a identificação celular pelo SCA®. Supostamente os debris foram formados devido as soluções de sais presentes na composição deste diluidor ou por uma reação química entre os componentes do diluidor de congelamento BotuCrio® e o de rediluição TALP *sperm*.

Os nossos resultados mostraram que os diluidores BotuCrio®, TALP *sperm* e solução fisiológica são igualmente adequados para rediluição do sêmen equino criopreservado quando analisado o parâmetro de MT. Quando analisada a ALH, percebe-se que a rediluição em BotuCrio® e Solução fisiológica foi maior do que nas amostras diluídas em BotuSêmen e TALP *sperm*. O emprego de Solução fisiológica tem a vantagem do baixo custo, favorece a visualização dos espermatozoides pois mantém o campo de visão limpo, sem a presença de grânulos ou debris que venham a interferir na identificação celular pelo CASA (FARREL et al., 1996).

Silva et al. (2014) relatou uma interferência significativa na cinética dos espermatozoides ovino criopreservados em diferentes diluidores à base de Tris-gema e Tris- LDL (low density lipoproteins) após a rediluição das amostras com

Solução fisiológica. O uso de soluções isosmóticas podem influenciar negativamente na motilidade espermática de amostra diluídas pós-descongelamento para ajuste da concentração espermática, podendo esse fato ser atribuído ao stress osmótico ocasionado pelo aumento da permeabilidade do glicerol e água através da membrana espermática (BALL, 2001). Entretanto, corroborando com nossos resultados, Contri et al. (2010) não observaram efeito prejudicial sobre alguns parâmetros cinéticos com o emprego de Solução fisiológica para rediluição e ajuste da concentração espermática de amostras avaliadas pelo CASA.

## 7 CONCLUSÕES

Para a avaliação do sêmen equino criopreservado utilizando o SCA® é indicado o emprego de uma velocidade de captura de 25 imagens/segundo em 50 Hz, conseguindo assim, avaliar toda a trajetória dos espermatozoides equino criopreservados.

As câmaras lâmina sob lamínula, Leja® 10 µm e Leja® 20 µm utilizadas para análise de sêmen pelo SCA® apresentaram influência sobre os resultados de cinética espermática. Indica-se o emprego de lâmina sob lamínula para avaliação do sêmen equino, devido baixo custo e por não influenciar negativamente os resultados de cinética espermática.

Para avaliação do sêmen equino pelo SCA® é indicado o uso de uma diluição que garanta uma concentração espermática entre 25 e 50 x10<sup>6</sup>/ mL, tendo em vista que a utilização de 100 x10<sup>6</sup> espermatozoides por mL influenciará negativamente os parâmetros de cinética dos espermatozoides.

O diluidor indicado para a realização da rediluição do sêmen equino deve ser preferivelmente o mesmo utilizado na congelamento do sêmen, caso não seja possível a identificação deste, o segundo diluidor a ser indicado é o TALP *sperm* e por último indica-se a Solução fisiológica.

## REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A. S. L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1, p.105-113, 2005.
- AMANN, R.P.; KATZ, D.F. Andrology Lab Corner: Reflections on CASA After 25 Years. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, p. 317-325, 2004.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, n.3, p. 145-173, 1987.
- ARAÚJO, R. V. D. **Motilidade, velocidade e fertilidade do sêmen de surubim-do-piraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes) criopreservado em diferentes diluidores**. 2013. 92f. Tese (doutorado em Produção animal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2013.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. D. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.35, p.145-151, 2011.
- BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 6, p. 1061-1069, 2001.
- BUDWORTH, P.R.; AMMAN, R.P.; HAMERSTED, R.H. A microcomputer photographic method for evaluation of motility and velocity in bull sperm. **Journal Dairy Science**, v.70, p.1927-1936, 1987.
- BRANDÃO, A. C. **Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoide criopreservados de equinos**. 2008. 87f. Tese (doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- SIDRA- **Sistema IBGE de Recuperação Automático**, 2010. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2012/tabelas\\_pdf/tab03.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2012/tabelas_pdf/tab03.pdf). Acesso em: 01 novembro de 2014.
- BROEKHUIJSE, M. L. W. J.; ŠOŠTARIĆ, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B. M. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1473-1486, 2011.
- CASTELLINI, C.; BOSCO, B. A.; RUGGERI, S.; COLLODEL, G. What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis? **Fertility and Sterility**, v. 96.1, p. 24-27, 2011.

CENTOLA, G. M. Comparison of manual microscopic and computer-assisted methods for analysis of sperm count and motility. **Archives of Andrology**, v. 36, n. 1, p. 1-7, 1996.

COETZEE, K.; KRUGER, T.F.; LOMBARD, C.J.; Repeatability and variance analysis on multiple computer-assisted (IVOS) sperm morphology readings. **Andrologia**. v.31, n. 3, p.163-168, 1999.

CONTRI, A.; VALORZ, C.; FAUSTINI, M.; WEGHER, L.; CARLUCCIO, A. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, n. 3, p. 424-435, 2010.

COX, J. F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 860-867, 2006.

DA SILVA, M. C.; DE OLIVEIRA MOURA, L. C.; DE MELO, M. I. V.; DE MELO MAMBRINI, J. V.; NEVES, M. M.; HENRY, M. R. J. M.; DAS NEVES SNOECK, P. P. Prolonged post cooling but not pre-cooling equilibrium length improves the viability of ram sperm cryopreserved in an extender containing low-density lipoproteins. **Small Ruminant Research**, v.119, n.1, p. 88-95, 2014.

DAVIS, R. O.; KATZ, D.F. Operational standards for CASA instruments. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 5, p. 385-394, 1993.

DAVID, G.; SERRES, C.; JOUANNET, P. Kinematics of human spermatozoa. **Gamete Research**, v. 4, n. 2, p. 83-95, 1981.

DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; SMITH, N. G.; KUSTER, C. E.; VERMEIDEN, J. P.; ALTHOUSE, G. C. Particle Distribution in Low-Volume Capillary-Loaded Chambers. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 1, p. 107-114, 2005.

DOTT, H. M.; FOSTER, G. C. A. The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 55, n. 1, p. 161-166, 1979.

EHLERS, J.; BEHR, M.; BEYERBACH, M.; WABERSKI, D. Standardization of computer-assisted semen analysis using an e-learning application. **Theriogenology**, v.76.3, p. 448-454, 2011.

ESHRE, ASIG. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. ESHRE Andrology Special Interest Group. European Society for Human Reproduction and Embryology. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 13, p. 142-145, 1998.

FARRELL, P.; TROUERN-TREND, V.; FOOTE, R. H.; DOUGLAS-HAMILTON, D. Repeatability of measurements on human, rabbit, and bull sperm by computer-assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. **Fertility and sterility**, v. 64, n. 1, p. 208-210, 1995.

FARREL, P.B.; FOOTE, R.H.; MCARDLE, M.M.; TROUERN-TREND, V.J.; TADIRF, A.L. Media and Dilution Procedures Tested to Minimize Handling

- Effects on Human, Rabbit, and Bull Sperm for Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA). **Journal of Andrology**, v. 17, n. 3, p. 293-300, 1996.
- FARRELL, P. B.; PRESICCE, G. A.; BROCKETT, C. C.; FOOTE, R. H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 49, n. 4, p. 871-879, 1998.
- GAŁCZARZEWICZ, D. Influence of chamber type integrated with computer-assisted semen analysis (CASA) system on the results of boar semen evaluation. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 18, n. 4, p. 817-824, 2015.
- GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 12, n. 1, p. 131-147, 1996.
- GRAY, J. The movement of the spermatozoa of the bull. **Journal of Experimental Biology**, v. 35, n. 1, p. 96-108, 1958.
- GLORIA, A.; CARLUCIO, A.; CONTRO, A.; WEGHER, L.; VALORZ, C.; ROBBE, D. The effect of the chamber on kinetic results in cryopreserved bull spermatozoa. **Andrology**, v. 1, p. 879-885, 2013.
- HOOGEWIJS, M. K.; VLIEGHER, S. P., GOVAERE, J. L.; SCHAUWER, C.; KRUIF, A.; SOOM, V.A. Influence of counting chamber type on CASA outcomes of equine semen analysis. **Equine Veterinary Journal**, v.44.5, p.542-549, 2012.
- HOOGEWIJS, M.; DE VLIEGHER, S.; DE SCHAUWER, C.; GOVAERE, J.; SMITS, K.; HOFACK, G.; VAN SOOM, A. Validation and usefulness of the Sperm Quality Analyzer V equine for equine semen analysis. **Theriogenology**, 75, n.1, p.189-194. 2011.
- IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. P. Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. **Theriogenology**, v. 55, n. 3, p. 733-749, 2001.
- KATILA, T.: In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen. A review. **Acta Veterinaria Scand.** v. 42, p. 201-217, 2001.
- KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; EDWIN, M. J.; VEERAPANDIAN, C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 1, p. 9-17, 2008.
- KATZ, D. F.; DAVIS, R. O.; DELANDMETER, B. A.; OVERSTREET, J. W. Real-time analysis of sperm motion using automatic video image digitization. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 21, n. 3, p. 173-182, 1985.
- KLIMOWICZ, M. D.; NIZANSKI, W.; BATKOWSKI, F.; SAVIC, M. A. The comparison of assessment of pigeon semen motility and sperm concentration by conventional methods and the CASA system (HTM IVOS). **Theriogenology**, v. 70, n. 1, p. 77- 82, 2008.

KRAEMER, M.; FILLION, C.; MARTIN-PONT, B.; AUGER, J. Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system. **Human Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 611-619, 1998.

LE LANNOU, D.; GRIVEAU, J. F.; LE PICHON, J. P.; QUERO, J. C. Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in semen or in capacitating medium. **Human Reproduction**, v. 7, n. 10, p. 1417-1421, 1992.

LENZ, R. W.; KJELLAND, M. E.; VONDERHAAR, K.; SWANNACK, T. M.; MORENO, J. F. A comparison of bovine seminal quality assessments using different viewing chambers with a computer-assisted semen analyzer. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 2, p. 383-388, 2011.

LIMA, R. A. S.; OLIVEIRA, R. A. MENDES, C. Q.; JÚNIOR, P. G. Perfil e Tendências da Equideocultura Brasileira. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49<sup>a</sup>, 2012, Brasília. **Anais...** Brasília, 2012.

MACK, S. O.; WOLF, D. P.; TASH, J. S. Quantitation of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 2, p. 270-281, 1988.

MATOS, D.L.; ARAUJO, A. A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008.

MORRIS, A. R.; COUTTS, J. R.T.; ROBERTSON, L. A detailed study of the effect of video frame rates of 25, 30 and 60 Hertz on human sperm movement characteristics. **Human Reproduction**, v.11.2, p.304-310, 1996.

MORTIMER, D.; GOEL, N.; SHU, M.A. Evaluation of the CellSoft automated semen analysis system in a routine laboratory setting. **Fertility and Sterility**, v.50, p.960-968, 1988.

MORTIMER, S. T.; SWAN, M. A. Variable kinematics of capacitating human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 10, n. 12, p. 3178-3182, 1995.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**. v.3, p.403-439, 1997.

MORTIMER, S.T. CASA—practical aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.

MORTIMER, S. T.; VAN DER HORST, G.; MORTIMER, D. The future of computer-aided sperm analysis. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 4, p. 545, 2015.

NORMAN, P. S.; HILL, B. M. Studies of the plasmin system III. Physical properties of the two plasmin inhibitors in plasma. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 108, n. 5, p. 639-649, 1958.

OLIVEIRA, G. C.; OLIVEIRA B. M. M.; ARRUDA, R. P.; ZAFFALON, F. G.; NASCIMENTO, J.; FERNANDES, C. B.; CELEGHINI, E.C.C. Características espermáticas do sêmen equino congelado com diferentes crioprotetores. In:

CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 9ª, 2010, São Paulo. **Anais...** São Paulo, SP: ABRAVEQ, 2010.v.29, p.304-305.

OLIVEIRA, L. Z.; DE ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F. C.; CELEGHINI, E. C. C.; REEB, P. D.; MARTINS, J. P. N.; SANTOS, R.M.; BELLETI, M.E.; PERES, R.F.G.; MONTEIRO, F.M.; DE LIMA, V. F. M. H. Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Animal Reproduction Science**, v. 137, n. 3, p. 145-155, 2013.

OWEN, D. H.; KATZ, D. F. Sampling factors influencing accuracy of sperm kinematic analysis. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 3, p. 210-221, 1993.

PALACÍN, I.; VICENTE-FIEL, S.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J. L. Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. **Small Ruminant Research**, v. 112, n. 1, p. 128-135, 2013.

QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; RIGAU, A. T.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenology**, v. 59, n. 9, p. 1973-1990, 2003.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. **Theriogenology**, v. 60, n. 8, p. 1553-1568, 2003.

RIKMENSPOEL, R.; VAN HERPEN, G. Photoelectric and cinematographic measurements of the motility of bull sperm cells. **Physics in Medicine and Biology**, v. 2, n. 1, p. 54, 1957.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2015. URL <http://www.R-project.org/>.

ROTHSCHILD, Lord. A new method of measuring sperm speeds. **Nature**, v. 171, p. 512-513, 1953.

SANCHES, E. A.; MARCOS, R. M.; BAGGIO, D. M.; TESSARO, L.; BALEN, R. E.; BOMBARDELLI, R. A. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermátocrito. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 1163-1167, 2011.

SEAMAN, E. K.; GOLUBOFF, E.; BARCHAMA, N.; FISCH, H. Accuracy of semen counting chambers as determined by the use of latex beads. **Fertility and Sterility**, V. 66, N. 4, P. 662-665, 1996.

SILVA, M.C; MOURA, LC.O; MELO, M.I.V; MAMBRINI,J.V.M; NEVES, M.M.; HENRY, M.R.J.M.; SNOECK, P.P.N. Prolonged post cooling but not pre cooling equilibrium length improves the viability of ram sperm cryopreserved in an extender containing low density lipoproteins. **Small Ruminant Research**, v.119, p 88-95, 2014.

SLOTT, V. L.; SUAREZ, J. D.; POSS, P. M.; LINDER, R. E.; STRADER, L. F.; PERREAULT, S. D. Optimization of the Hamilton-Thorn computerized sperm motility analysis system for use with rat spermatozoa in toxicological studies. **Toxicological Sciences**, v. 21, n. 3, p. 298-307, 1993.

SLOTT, V. L.; JEFFAY, S. C.; SUAREZ, J. D.; BARBEE, R. R.; PERREAULT, S. D. Synchronous Assessment of Sperm Motility and Fertilizing Ability in the Hamster Following Treatment With -Chlorohydrin. **Journal of Andrology**, v. 16, p. 523-535, 1995.

SCHÄFER-SOMI, S.; AURICH, C. Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. **Animal Reproduction Science**, v. 102, n. 1, p. 1-13, 2007.

SCHLEH, C.; LEONI, A.L. How to optimize the benefits of computer assisted sperm analysis in experimental toxicology. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 8, n. 6, 2013.

SUKCHAROEN, N.; NGEAMJIRAWAT, J.; CHANPRASIT, Y.; ARIBARG, A. A comparison of Makler counting chamber and improved Neubauer hemocytometer in sperm concentration measurement. **Journal Medicine Association Thailand**, v. 77, n. 9, p. 471- 476, 1994.

TOMLINSON, M.J.; POLLEY, K., SIMPSON, T.; NEWTON, T.; HOPKISSON, J.; JAYAPRAKASAN, K.; PRIDMORE, T. Validation of a novel computer-assisted sperm analysis (CASA) system using multitarget-tracking algorithms. **Fertility and Sterility**, v. 93, n.6, p. 1911-1920, 2010.

UPRETI, G. C.; JENSEN, K.; MUNDAY, R.; DUGANZICH, D. M.; VISHWANATH, R.; SMITH, J. F. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. **Animal Reproduction Science**, v. 51, n. 4, p. 275-287, 1998.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

VIANNA, W. L.; BRUNO, D. G.; NAMINDOME, A.; ROSSETO, A. C.; RODRIGUES, P. H. M.; PINESE, M. E.; MORETTI, A. D. S. Estudo comparativo da eficiência de diferentes técnicas de mensuração da concentração espermática em suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33 n.6, p. 2054-2059. 2004.

VENABLES, W.N.; RIPLEY, B.D. **Modern Applied Statistics with S**. Springer, New York, fourth edition, 2002. URL <http://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4>. ISBN 0-387-95457-0.

WATSON, P. F.; PLUMMER, J. M. The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON DEEP FREEZING OF BOAR SEMEN, UPPSALA (SWEDEN), 1985, Sveriges Lantbruksuniv,1985.