



## Padronização do Sperm Class Analyzer® (SCA®) para avaliação de espermatozoides equinos criopreservados

[Standardization of the Sperm Class Analyzer® (SCA®) for the evaluation of cryopreserved equine sperm]

P.P.N. Snoeck, T.H.O. Pessoa, C.H.S.C. Barros, I.B. Allaman

Universidade Estadual de Santa Cruz - Ilhéus, BA

### RESUMO

Objetivou-se, no primeiro experimento, avaliar o efeito da velocidade de captura de imagens de 25Hz, 30Hz e 50Hz na cinética dos espermatozoides equinos criopreservados. Todas as velocidades mostraram-se adequadas para capturar o movimento espermático ( $P>0,05$ ). No segundo experimento, objetivou-se avaliar o efeito da deposição de sêmen em lâmina sob lamínula, Leja®10 e 20, na cinética espermática. O uso de lâmina e lamínula foi superior às lejas para manter a LIN e o WOB ( $P<0,05$ ). No terceiro experimento, objetivou-se avaliar o efeito das concentrações de 25, 50 e  $100 \times 10^6$  na cinética espermática. As concentrações de 25 e  $50 \times 10^6$  foram superiores a  $100 \times 10^6$  para preservar a LIN, a STR e a BCF e não afetar negativamente a motilidade ( $P<0,05$ ). No quarto experimento, objetivou-se avaliar o efeito dos diluidores BotuCrio®, BotuSêmen®, TALP sperm e da solução fisiológica na cinética espermática. O BotuCrio® foi superior a todos os diluidores em preservar a BCF e os hiperativos ( $P<0,05$ ). Conclui-se que o emprego da velocidade de captura entre 25 e 50Hz, a deposição do sêmen entre lâmina e lamínula e a rediluição em diluidor de congelação para atingir 25 a  $50 \times 10^6$  de espermatozoides/mL são ideais para o SCA® avaliar, de forma fidedigna, o sêmen equino criopreservado.

Palavras-chave: congelação, sêmen, garanhão, análise computadorizada de espermatozoides (CASA)

### ABSTRACT

The objective of the first experiment was to evaluate the effect of 25, 30 and 50Hz frame acquisition rate on equine cryopreserved sperm. All frame acquisition rates tested were adequate to capture the sperm movement ( $P>0.05$ ). The aim of the second experiment was to evaluate the effect of chambers, slide-coverslip, Leja®10 and 20 on sperm movement. The use of slide-coverslip was superior to maintain LIN and WOB ( $P<0.05$ ). The aim of the third experiment was to evaluate the effect of 25, 50 and  $100 \times 10^6$  sperm/mL concentration on sperm movement. Concentrations of 25 and  $50 \times 10^6$  sperm/mL were greater than  $100 \times 10^6$  to preserve LIN, STR and BCF and did not adversely affect motility ( $P<0.05$ ). The aim of the fourth experiment was to evaluate the effect of BotuCrio®, BotuSêmen®, TALP sperm and physiological solution on sperm movement. BotuCrio® was superior among other extenders in preserving BCF and hyperactive ( $P<0.05$ ). It is concluded that the use of the frame acquisition rate between 25 and 50 Hz; the deposition of semen between slide and coverslip and new dilution in the freezing extender to  $25-50 \times 10^6$  of sperm/mL is ideal to reliably evaluate cryopreserved equine semen by SCA®.

Keywords: freezing, semen, stallion, computer-assisted sperm analysis (CASA)

### INTRODUÇÃO

Tradicionalmente a motilidade espermática é avaliada pelo método convencional, utilizando-se microscópio óptico comum e técnico experiente.

Entretanto, é possível que ocorra uma variação entre avaliações de 30 a 60%, dependendo do técnico, sendo, portanto, possível constatar a subjetividade dessa avaliação, que é imprecisa e

Recebido em 19 de dezembro de 2019

Aceito em 6 de janeiro de 2020

E-mail: paolasnoeck@uesc.br

sujeita a grande variabilidade (Verstegen et al., 2002).

Um alternativa para reduzir essa variabilidade é o uso de sistemas computadorizados (CASA), como o CellSoft®, HTM 2000® Hamilton-Thorn Research, HTM-IVOS Sperm Analyzer®, HTM-CEROS 12.1®, SCA-Sperm Class Analyzer® (Farrel et al., 1999; Schäfer-Somi e Aurich, 2007; Hoogewijs et al., 2012; Gaczarzewicz, 2015; Giaretta et al., 2017), pois são capazes de determinar uma série de variáveis do movimento espermático, como motilidade total e progressiva, velocidade curvilínea, velocidade linear progressiva, velocidade média da trajetória, linearidade, retilinearidade, frequência do batimento flagelar e amplitude do deslocamento lateral da cabeça de muitas células, simultaneamente e de forma individual, que não podem ser determinados pelo olho humano (Quintero-Moreno et al., 2003).

O CASA é uma ferramenta importante para avaliação da cinética espermática. Ele fornece informações precisas, objetivas e com alta repetibilidade, apresenta facilidade de manuseio e de configuração do sistema, possibilidade de quantificar um grande número de células com padrão de motilidade heterogêneo, em um curto período de tempo, fornecendo informações adicionais sobre as características de movimentação celular impossíveis de serem analisadas pelo método convencional (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).

As desvantagens do CASA, que podem tornar seu uso limitado, são o elevado custo do equipamento, a necessidade de validação do sistema para avaliar amostras de sêmen de diferentes espécies, a necessidade de correlação dos parâmetros com dados de fertilidade e a padronização do sistema com uso de procedimentos operacionais adequados (Davis e Katz, 1993; Verstegen et al., 2002) para tornar a avaliação precisa. Outro aspecto a ser ressaltado é a possibilidade de possíveis erros de interpretação, como a dificuldade do sistema de distinguir espermatozoides de debris ou partículas suspensas

presentes em diluidores seminais, por exemplo, as gotículas de gordura presentes na gema de ovo, componente importante dos meios de refrigeração e congelamento, o que leva à superestimação da concentração espermática e à redução do percentual de espermatozoides móveis (Mortimer, 1997). Além disso, alguns fatores podem interferir nos parâmetros cinéticos obtidos pelo sistema, como a temperatura da placa do microscópio, que reflete na temperatura da amostra; a velocidade de captura das imagens por segundo; a concentração de espermatozoides na amostra; o tipo de diluidor usado na diluição para ajuste da concentração de células/mL; e a câmara onde a amostra é depositada para avaliação; entre outros (Rijsselaere et al., 2003; Castellini et al., 2011; Gaczarzewicz, 2015).

Por isso, objetivou-se a padronização do *Sperm Class Analyser*® (SCA) para avaliação dos parâmetros de movimento espermático, importantes para fertilidade, em amostras de sêmen equino criopreservadas, de forma a garantir precisão, objetividade e resultados fidedignos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (Ceua/Uesc) da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, Brasil, com o número de protocolo 013/11.

Foram utilizadas amostras de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Machador, previamente congeladas em diluidor BotuCrio® (Botupharma, Botucatu, SP), utilizando-se curva de refrigeração de 0,5°C/min, em temperatura ambiente até 5°C, equilíbrio de 30 minutos nessa temperatura e congelamento com uma curva de -10°C/min de 5°C até -140°C, em máquina TK4000® (TK Tecnologia em Congelamento Ltda., Uberaba, MG). As palhetas de 0,5mL foram armazenadas por um período mínimo de quatro meses e máximo de 24 meses, em botijão criogênico.

Para as avaliações do movimento espermático, foram descongeladas duas palhetas de 0,5mL de sêmen de cada garanhão em banho-maria, a 46°C, por 20 segundos. O sêmen descongelado foi mantido por, no mínimo, cinco minutos e, no máximo, 15 minutos, em banho seco a 37°C, antes da análise computadorizada de sêmen pelo SCA® (*Sperm Class Analyser*®, v.5.2, Microoptics S.L, Barcelona, Espanha).

Os padrões utilizados para ajuste do equipamento tiveram como base as recomendações do programa *Sperm Class Analyzer*<sup>®</sup> para análise de sêmen da espécie equina: tamanho de partícula capturada entre 4 e 75µm/m<sup>2</sup>; espermatozoides considerados imóveis <10µm/s, lentos <45µm/s, médios de 45 a 90µm/s e rápidos acima de 90µm/s; progressivos com retilinearidade >70%; circular com linearidade <50% e captura de 25 imagens por segundo. Em cada amostra, foram avaliados, no mínimo, três campos escolhidos aleatoriamente e 500 espermatozoides, e os parâmetros mensurados foram: motilidade total (MT-%); motilidade progressiva (MP-%); linearidade (LIN); retilinearidade (STR); índice de oscilação (WOB) e hiperativos expressos em porcentagem (%); velocidade curvilinear (VCL); velocidade linear progressiva (VSL) e velocidade média do trajeto (VAP), expressas em micrômetros por segundo (µm/s); amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), expressa em micrômetros (µm); e frequência do batimento flagelar cruzado (BCF), expressa em Hertz (Hz).

No primeiro experimento, 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 no movimento dos espermatozoides. As amostras foram rediluídas em diluidor comercial BotuCrio<sup>®</sup>, para se obter uma concentração final de 25 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, e foi retirada uma alíquota de 5µL em triplicata, com deposição em lâmina sob lamínula (22mm x 22mm), para testar a captura de 25 imagens por segundo, com velocidades de 25Hz; 30Hz e 50Hz.

No segundo experimento, foram descongeladas 28 palhetas, duas de cada garanhão, para testar o efeito da deposição do sêmen em diferentes câmaras no movimento espermático. O sêmen foi rediluído em BotuCrio<sup>®</sup>, para uma concentração final de 25 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, e depositado em lâmina sob lamínula, Leja<sup>®</sup> 10µm e 20µm. Para o preenchimento das câmaras, foi utilizado um volume seminal de 2µL, 5µL e 6µL para a Leja<sup>®</sup> 10µm, lâmina sob lamínula e Leja<sup>®</sup> 20µm, respectivamente. O preenchimento das câmaras ocorreu de acordo com as recomendações

do fabricante. Após a preparação, cada câmara foi deixada em repouso por 30 segundos, a uma temperatura de 37°C, para evitar movimento do fluido internamente e comprometimento da análise. O SCA<sup>®</sup> foi regulado para capturar 25 imagens/segundo, com velocidade de captura de 50Hz.

No terceiro experimento, foram descongeladas 44 palhetas, duas de cada garanhão, para testar o efeito da taxa de diluição no movimento espermático. As amostras foram rediluídas em BotuCrio<sup>®</sup> para garantir as seguintes diluições: 25x10<sup>6</sup>, 50x10<sup>6</sup> e 100x10<sup>6</sup> de espermatozoides/mL. O SCA<sup>®</sup> foi regulado para capturar 25 imagens/segundo com velocidade de captura de 50Hz, e foram depositados 5µL da amostra em lâmina sob lamínula (22mm x 22mm).

No quarto experimento foram descongeladas 44 palhetas, duas de cada garanhão, para testar o efeito dos diluidores BotuCrio<sup>®</sup>, BotuSêmen<sup>®</sup>, TALP *sperm* e solução fisiológica para ajuste da concentração espermática final de 25x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL no movimento espermático. O SCA<sup>®</sup> foi regulado para capturar 25 imagens/segundo, com velocidade de captura de 50Hz, e foram depositados 5µL da amostra em lâmina sob lamínula (22mm x 22mm).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, considerando-se o garanhão como bloco. Foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) para testar as diferenças entre os tratamentos e, quando essas foram detectadas, foi utilizado o teste de Tukey. Todos os pressupostos foram testados e, quando violados, foi utilizada a transformação boxcox, por meio da função “boxcox” do pacote MASS, versão 7.3-41. O teste de Friedman foi utilizado quando a transformação não resolveu o problema nos pressupostos da ANOVA. Todos os dados de movimento espermático gerados pelo sistema de análise computadorizada de sêmen em todos os experimentos foram salvos na base de dados do sistema, registrados em planilhas de Excel e submetidos à análise estatística, com auxílio do R Core Team (2015). O nível de significância adotado foi de 5%.

## RESULTADOS

Nota-se que as três velocidades de captura de 25 imagens/segundo foram semelhantes e não comprometeram nenhum movimento dos espermatozoides equinos criopreservados ( $P>0,05$ ; Tab. 1).

A câmara utilizada no SCA<sup>®</sup> influenciou os parâmetros de MP, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB e ALH ( $P<0,05$ ). Para os parâmetros

espermáticos MT, BCF e hiperativos, não houve diferença entre as câmaras testadas ( $P>0,05$ ). A MP, VSL e VAP foram maiores nas amostras depositadas entre lâmina e lamínula e Leja<sup>®</sup> 10 $\mu$ m do que na Leja<sup>®</sup> 20 $\mu$ m ( $P<0,05$ ). O uso de lâmina sob lamínula resultou em melhor LIN e WOB ( $P<0,05$ ) quando comparado ao emprego das câmaras lejas e resultou em melhor STR ( $P<0,05$ ) quando comparada a Leja<sup>®</sup> 10 $\mu$ m ( $P<0,05$ ). Houve maior VCL e ALH nas amostras depositadas em Leja<sup>®</sup> 10 $\mu$ m ( $P<0,05$ ; Tab. 2).

Tabela 1. Média e erro padrão do movimento dos espermatozoides equinos criopreservados avaliados nas diferentes velocidades de captura de imagem (25Hz, 30Hz e 50Hz) pelo SCA<sup>®</sup>

Parâmetros	Velocidade de captura de 25 imagens			Erro Padrão
	25Hz	30Hz	50Hz	
MT (%)	45,0	44,2	42,2	3,06
MP (%)	21,4	21,8	19,4	2,13
VCL ( $\mu$ m/s)	51,4	53,1	50,5	1,93
VSL ( $\mu$ m/s)	27,6	28,3	27,4	1,41
VAP ( $\mu$ m/s)	32,7	33,0	32,4	1,49
LIN (%)	53,3	52,4	54,0	1,97
STR (%)	83,4	83,2	83,7	1,03
WOB (%)	63,3	62,9	63,9	1,65
ALH ( $\mu$ m)	2,4	2,4	2,3	0,04
BCF (Hz)	15,9	15,6	15,8	0,71
HIPERATIVO (%)	6,8	7,3	5,9	0,91

Não houve diferença significativa pelo teste Tukey ( $P>0,05$ ). Motilidade total (MT-%), motilidade progressiva (MP-%), velocidade curvilínea (VCL- $\mu$ m/s), velocidade linear progressiva (VSL- $\mu$ m/s), velocidade média do trajeto (VAP- $\mu$ m/s), linearidade (LIN-%), retilinearidade (STR-%), índice de oscilação (WOB-%), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH- $\mu$ m) e frequência do batimento flagelar cruzado (BCF-Hz).

Tabela 2. Média e erro padrão do movimento dos espermatozoides equinos criopreservados avaliados pelo SCA<sup>®</sup> em lâmina sob lamínula, Leja<sup>®</sup> 10 $\mu$ m e 20 $\mu$ m

Parâmetros	Lâmina/lamínula	Leja <sup>®</sup> 10 $\mu$ m	Leja <sup>®</sup> 20 $\mu$ m	Erro Padrão
MT (%)	32,0	28,9	29,8	2,94
MP (%)	11,7 <sup>a</sup>	9,9 <sup>a</sup>	8,3 <sup>b</sup>	1,55
VCL ( $\mu$ m/s)	42,8 <sup>b</sup>	46,7 <sup>a</sup>	39,2 <sup>c</sup>	2,08
VSL ( $\mu$ m/s)	19,8 <sup>a</sup>	19,8 <sup>a</sup>	16,2 <sup>b</sup>	1,34
VAP ( $\mu$ m/s)	24,7 <sup>a</sup>	25,7 <sup>a</sup>	20,8 <sup>b</sup>	1,34
LIN (%)	45,4 <sup>a</sup>	41,4 <sup>b</sup>	40,5 <sup>b</sup>	1,68
STR (%)	78,4 <sup>a</sup>	74,9 <sup>b</sup>	76,2 <sup>ab</sup>	1,65
WOB (%)	57,7 <sup>a</sup>	54,5 <sup>b</sup>	52,7 <sup>b</sup>	1,17
ALH ( $\mu$ m)	2,2 <sup>b</sup>	2,3 <sup>a</sup>	2,2 <sup>ab</sup>	0,07
BCF (Hz)	16,8	16,7	16,6	0,77
HIPERATIVO (%)	3,1	3,0	2,2	0,61

Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey ou Friedman ( $P<0,05$ ). Motilidade total (MT-%), motilidade progressiva (MP-%), velocidade curvilínea (VCL- $\mu$ m/s), velocidade linear progressiva (VSL- $\mu$ m/s), velocidade média do trajeto (VAP- $\mu$ m/s), linearidade (LIN-%), retilinearidade (STR-%), índice de oscilação (WOB-%), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH- $\mu$ m) e frequência do batimento flagelar cruzado (BCF-Hz).

*Padronização do Sperm...*

A concentração espermática influenciou os resultados de MT, MP, LIN, STR e BCF (P<0,05). As concentrações espermáticas de 25 e

50x10<sup>6</sup>/mL resultaram em menor percentual de MT e MP e em maior LIN, STR e BCF do que a de 100 x10<sup>6</sup>/mL (P<0,05; Tab. 3).

Tabela 3. Média e erro padrão do movimento dos espermatozoides equinos criopreservados avaliados pelo SCA<sup>®</sup> depois do ajuste da concentração espermática para 25, 50 e 100x10<sup>6</sup>/mL

Parâmetros	Concentração espermática			Erro Padrão
	25 x10 <sup>6</sup> /mL	50 x10 <sup>6</sup> /mL	100 x10 <sup>6</sup> /mL	
MT (%)	49,2 <sup>b</sup>	52,1 <sup>b</sup>	65,6 <sup>a</sup>	3,17
MP (%)	17,7 <sup>b</sup>	18,1 <sup>b</sup>	22,4 <sup>a</sup>	2,28
VCL (µm/s)	51,0	50,4	52,9	2,92
VSL (µm/s)	19,5	18,9	18,8	1,42
VAP (µm/s)	25,9	25,6	26,9	1,66
LIN (%)	36,7 <sup>a</sup>	35,6 <sup>a</sup>	33,9 <sup>b</sup>	0,95
STR (%)	72,7 <sup>a</sup>	71,0 <sup>a</sup>	67,5 <sup>b</sup>	1,33
WOB (%)	50,1	49,8	49,9	0,55
ALH (µm)	2,3	2,2	2,2	0,08
BCF (Hz)	20,5 <sup>a</sup>	20,3 <sup>a</sup>	19,1 <sup>b</sup>	0,71
HIPERATIVO (%)	4,5	4,7	5,0	0,8

Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05). Motilidade total (MT-%), motilidade progressiva (MP-%), velocidade curvilínea (VCL- µm/s), velocidade linear progressiva (VSL-µm/s), velocidade média do trajeto (VAP-µm/s), linearidade (LIN-%), retilinearidade (STR -%), índice de oscilação (WOB -%), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH-µm) e frequência do batimento flagelar cruzado (BCF-Hz).

Os diluidores utilizados para a rediluição e o ajuste da concentração das amostras para análise do movimento espermático pelo SCA<sup>®</sup> influenciaram todas as variáveis estudadas (Tab. 4; P<0,05). A rediluição em BotuCrio<sup>®</sup> resultou em maiores parâmetros de MP e VCL quando comparado ao BotuSêmen<sup>®</sup> e a solução fisiológica (P<0,05), maiores parâmetros de VSL, VAP e

LIN quando comparado a solução fisiológica (P<0,05). A rediluição em BotuCrio<sup>®</sup> resultou em maior MT comparado ao BotuSêmen<sup>®</sup> (P<0,05), maior STR quando comparado ao TALP e a solução fisiológica (P<0,05), maior ALH quando comparado ao TALP (P<0,05) e maior BCF e hiperativos quando comparado aos demais diluidores testados (P<0,05).

Tabela 4. Cinética dos espermatozoides equinos criopreservados, rediluídos em BotuCrio<sup>®</sup>, BotuSêmen<sup>®</sup>, TALP *sperm* e solução fisiológica (SolFi) para avaliação pelo SCA<sup>®</sup>

Parâmetros	Diluidor				Erro Padrão
	BotuCrio <sup>®</sup>	BotuSêmen <sup>®</sup>	TALP	SolFi	
MT (%)	22,9 <sup>a</sup>	18,7 <sup>b</sup>	20,8 <sup>ab</sup>	19,9 <sup>ab</sup>	1,82
MP (%)	7,8 <sup>a</sup>	5,3 <sup>b</sup>	5,7 <sup>ab</sup>	4,7 <sup>b</sup>	0,95
VCL (µm/s)	37,1 <sup>a</sup>	32,6 <sup>bc</sup>	35,6 <sup>ab</sup>	31,2 <sup>c</sup>	1,83
VSL (µm/s)	20,4 <sup>a</sup>	17,6 <sup>ab</sup>	19,5 <sup>a</sup>	15,1 <sup>b</sup>	1,39
VAP (µm/s)	24,5 <sup>ab</sup>	21,4 <sup>bc</sup>	25,4 <sup>a</sup>	19,1 <sup>c</sup>	1,5
LIN (%)	53,2 <sup>a</sup>	50,3 <sup>ab</sup>	53,3 <sup>a</sup>	46,7 <sup>b</sup>	1,65
STR (%)	81,5 <sup>a</sup>	78,5 <sup>ab</sup>	75,8 <sup>b</sup>	77,1 <sup>b</sup>	1,22
WOB (%)	64,7 <sup>b</sup>	63,1 <sup>bc</sup>	69,6 <sup>a</sup>	60,0 <sup>c</sup>	1,29
ALH (µm)	2,4 <sup>a</sup>	2,1 <sup>ab</sup>	2,0 <sup>b</sup>	2,2 <sup>ab</sup>	0,12
BCF (Hz)	10,5 <sup>a</sup>	9,1 <sup>b</sup>	7,9 <sup>b</sup>	8,3 <sup>b</sup>	0,46
HIPERATIVO (%)	3,5 <sup>a</sup>	2,2 <sup>b</sup>	1,8 <sup>b</sup>	2,2 <sup>b</sup>	0,46

Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05). Motilidade total (MT-%), motilidade progressiva (MP-%), velocidade curvilínea (VCL- µm/s), velocidade linear progressiva (VSL-µm/s), velocidade média do trajeto (VAP-µm/s), linearidade (LIN-%), retilinearidade (STR -%), índice de oscilação (WOB -%), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH-µm) e frequência do batimento flagelar cruzado (BCF-Hz).

## DISCUSSÃO

O número de imagens capturadas por segundo e a velocidade de captura destas é um fator importante para a reconstrução da trajetória real do espermatozoide durante sua movimentação (Kraemer *et al.*, 1998; Mortimer, 2000). Entretanto, ainda não existe uma padronização com relação ao número de imagens e à velocidade de captura destas por segundo, 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).

As velocidades de captura das imagens testadas foram suficientes para reconstruir a trajetória dos espermatozoides equinos criopreservados. A velocidade mínima de captura de 25Hz não influenciou negativamente os parâmetros de movimento espermático, muito provavelmente porque a BCF das amostras eram inferiores a 25Hz (Katz *et al.*, 1985; Castellini *et al.*, 2011). No entanto, é importante ressaltar que, quando o objetivo é avaliar parâmetros cinéticos de sêmen com elevada motilidade e velocidade, o ideal é usar uma velocidade de captura acima de 50Hz (Mortimer *et al.*, 1988; Owen e Katz, 1993; Rijsselaere *et al.*, 2003). E, ainda, quanto maior a VCL, a VSL, a VAP e a BCF, maior a necessidade de captura de imagens/segundo com velocidade igual ou acima de 60Hz (Morris *et al.*, 1996; Rijsselaere *et al.*, 2003).

Outro ponto que interfere nos parâmetros de movimento espermático são os tipos de câmaras indicadas para deposição de sêmen (Verstegen *et al.*, 2002; Hoogewijs *et al.*, 2012; Gloria *et al.*, 2013; Del Gallego *et al.*, 2017). Por isso, optou-se por comparar as câmaras lejas indicadas pelo fabricante do SCA<sup>®</sup> com a lâmina sob lamínula muito utilizada na rotina dos laboratórios de andrologia para avaliação espermática. Contri *et al.* (2010), por exemplo, encontraram diferença significativa na VAP comparando Makler<sup>®</sup> e lâmina sob lamínula. E, segundo Le Lannou *et al.* (1992) e Kraemer *et al.* (1998), quando os espermatozoides têm elevada ALH, o ideal é utilizar câmaras que apresentam profundidade superior ou igual a 20µm, já que câmaras com profundidade menor, como a lâmina sob lamínula, restringem a amplitude do movimento espermático como observado nos resultados aqui apresentados.

É importante saber no momento da escolha da câmara qual o tipo de amostra que será avaliada (sêmen fresco, refrigerado ou congelado), de qual espécie e qual o tamanho da cauda do espermatozoide, tendo em vista que câmaras muito profundas podem complicar a análise e a identificação dos espermatozoides em um mesmo plano, e câmaras muito superficiais podem limitar o movimento natural do flagelo (Del Gallego *et al.*, 2017). No entanto, foi possível perceber que não houve influência dos tipos testados para avaliar a MT, a BCF e o percentual de hiperativos nas amostras de espermatozoides equinos criopreservados, embora essas câmaras apresentassem características distintas de profundidade (10 a 20µm), volume de preenchimento (5, 2 e 6µL), método de preenchimento (deposição ou capilaridade) e *design* (câmara aberta e fechada).

As lejas 10µm e 20µm são as mais indicadas pelo fabricante do SCA<sup>®</sup>. No entanto, o uso de Leja<sup>®</sup> 20µm resultou em redução de MP, VCL, VSL e VAP comparado com uso de lâmina sob lamínula e o uso das lejas resultou em redução da LIN, parâmetro de progressividade considerado importante. Por isso, não foi possível encontrar benefícios em seu uso devido ao custo elevado do produto e à possibilidade de danos espermáticos durante o preenchimento, por causa do efeito da capilaridade e da possível ação tóxica atribuída à cola e às tintas utilizadas na sua fabricação, o que pode resultar em redução de alguns parâmetros cinéticos importantes (Gloria *et al.*, 2013). Del Gallego *et al.* (2017) também relataram superioridade de parâmetros cinéticos dos espermatozoides de caprino quando usaram câmara em que a deposição do sêmen foi colocando a gota sob a superfície da lâmina (sistema aberto), em relação aos sistemas de preenchimento por capilaridade (sistema fechado).

Dois índices que indicam progressividade (LIN e STR) foram superiores quando a lâmina sob lamínula foi utilizada para avaliação dos espermatozoides equinos criopreservados. Portanto, a lâmina sob lamínula pode ser considerada uma boa opção de uso para avaliação pelo SCA<sup>®</sup>, pois apresenta as vantagens de ter baixo custo, ser de fácil manuseio pela deposição da amostra em cima da lâmina recoberta com lamínula, ser descartável, com menos

contaminação do meio ambiente porque não possui cola e tinta para vedar o sistema e torná-lo fechado e pode ser lavada e reutilizada em outras análises. Importante ressaltar que as lâminas lavadas não devem ser reutilizadas para avaliações espermáticas no SCA<sup>®</sup>, tendo em vista que geram imagens de qualidade duvidosa. Registra-se que somente lâminas e lamínulas novas e bem transparentes devem ser usadas.

Uma concentração espermática adequada no momento da análise computadorizada é necessária para avaliações fidedignas e reais de movimento e velocidade dos espermatozoides. Nota-se que houve maior percentual de MT e MP nas amostras criopreservadas de sêmen equino contendo  $100 \times 10^6$  /mL. Esse resultado não pode ser considerado positivo porque, quando o sêmen está muito concentrado, o batimento do flagelo dos espermatozoides rápidos irá desencadear pequenos movimentos naqueles imóveis, que serão considerados lentos pelo sistema computadorizado (Contri *et al.*, 2010) e entram no computo do percentual total de móveis. Além disso, os espermatozoides podem ser avaliados em diferentes campos focais e o sistema pode fazer a leitura do mesmo espermatozoide mais de uma vez, gerando um maior percentual de espermatozoides móveis. Por isso, constatou-se que concentração espermática igual ou superior a  $100 \times 10^6$ /mL gera resultados não confiáveis, o que ratifica os resultados obtidos por Verstegen *et al.* (2002), Rijsselaere *et al.* (2003) e Contri *et al.* (2010). O uso de amostras concentradas de sêmen resulta em erros de análise pela não identificação do real padrão do movimento celular em rápido, médio, lento e estático, que influencia o resultado final da motilidade avaliada pelo SCA<sup>®</sup>. Uma menor quantidade de espermatozoides no campo de captura reduz a ocorrência de colisões entre as células e, consequentemente, melhora os parâmetros cinéticos de progressividade, como LIN, STR e BCF (Farrel *et al.*, 1996; Contri *et al.*, 2010) como observado nos resultados aqui apresentados.

Para sêmen equino criopreservado, foi possível perceber que o uso de amostras contendo 25 e  $50 \times 10^6$  de espermatozoides/mL facilita a avaliação pelo SCA<sup>®</sup> e a torna mais objetiva e fidedigna. Outros autores também encontraram resultados semelhantes, quando trabalharam com sêmen humano, equino, bovino e com coelhos (Farrel *et*

*al.*, 1996; Contri *et al.*, 2010; Hoogewijs *et al.*, 2012).

Para o ajuste da concentração de espermatozoides das amostras que serão avaliadas pelos sistemas computadorizados, é importante usar diluidores apropriados, ou seja, diluidores, meios ou extensores que não prejudiquem nem alterem o movimento natural do flagelo do espermatozoide e que permitam boa visualização das células. Neste estudo, foi verificado o efeito dos diluidores BotuCrio<sup>®</sup>, BotuSêmen<sup>®</sup>, TALP *sperm* e solução fisiológica no movimento dos espermatozoides equinos avaliados pelo SCA<sup>®</sup>, com o objetivo de encontrar um meio mais adequado, já que os dois primeiros são muito utilizados no Brasil para congelar e resfriar sêmen equino.

O BotuCrio<sup>®</sup> foi melhor que os diluidores BotuSêmen<sup>®</sup> e solução fisiológica para manter a MP e VCL, foi melhor que a solução fisiológica para manter a VSL, a VAP e a LIN e as amostras tiveram maior BCF e percentual de hiperativos quando comparado aos demais diluidores testados. Nota-se que a utilização do diluidor BotuCrio<sup>®</sup> na rediluição dos espermatozoides evitou a ocorrência do estresse osmótico e iônico em virtude de ter preservado o mesmo ambiente extracelular. Ou seja, os espermatozoides não tiveram que se adaptar a uma nova composição de meio, osmolaridade e pH diferente. Foi possível perceber que o emprego de BotuSêmen<sup>®</sup> alterou os parâmetros de motilidade, e o emprego de solução fisiológica alterou os parâmetros de motilidade e velocidade.

Quando o diluidor utilizado para a congelamento de sêmen equino não for informado, o segundo diluidor de escolha para a rediluição e o ajuste da concentração espermática pode ser o TALP *sperm*. Inclusive Farrel *et al.* (1996) indicaram o meio Talp para diluir amostras de sêmen humano, de coelho e bovino. O diluidor TALP *sperm* preservou, de maneira semelhante ao BotuCrio<sup>®</sup>, os parâmetros de motilidade, velocidade e linearidade, provavelmente em razão da presença do piruvato na sua composição, que é considerado um excelente substrato energético (Upreti *et al.*, 1998). Apesar dos aspectos positivos, o TALP *sperm* é complexo para ser preparado, pois entram na sua formulação muitos reagentes, ele necessita de ajuste de pH, requer filtração e tem custo elevado. Além disso, foi possível perceber, no decorrer das análises, formação de debris que

geravam aglutinação celular, comprometiam o movimento espermático e a identificação celular pelo SCA®. Supostamente os debris foram formados por causa dos sais presentes na composição desse diluidor ou por uma reação química entre os componentes do diluidor de congelamento BotuCrio® e o de rediluição TALP sperm.

Silva et al. (2014) relataram uma interferência significativa na cinética dos espermatozoides ovinos criopreservados após a rediluição das amostras com solução fisiológica, fato que também ocorreu com o sêmen congelado equino neste estudo. O uso de soluções isosmóticas pode influenciar negativamente parâmetros cinéticos importantes para a fertilidade quando amostras criopreservadas são avaliadas. Apesar disso, é interessante ressaltar que o emprego de solução fisiológica tem a vantagem do baixo custo e de favorecer a visualização dos espermatozoides, pois mantém o campo de visão limpo, sem a presença de grânulos ou debris que possam interferir na identificação celular pelo sistema computadorizado (Farrel et al., 1996). Por isso, pode ser uma opção quando as amostras a serem avaliadas forem de sêmen fresco ou refrigerado.

### CONCLUSÃO

Para a avaliação do sêmen equino criopreservado utilizando o SCA® é indicado o emprego de uma velocidade de captura entre 25 e 50Hz, embora quanto mais rápido for o movimento espermático maior deve ser a velocidade de captura escolhida. O sêmen deve ser depositado entre lâmina e lamínula devido ao baixo custo e por não influenciar negativamente os resultados cinéticos. A rediluição deve garantir concentração espermática entre 25 e 50 x10<sup>6</sup>/ mL, com uso preferencial do mesmo diluidor utilizado no processo de criopreservação.

### REFERÊNCIAS

CASTELLINI, C.; BOSCO, B.A.; RUGGERI, S. et al. What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis? *Fertil. Steril.*, v.96, p.24-27, 2011.

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

DAVIS, R.O.; KATZ, D.F. Operational standards for CASA instruments. *J. Androl.*, v.14, p.385-394, 1993.

DEL GALLEGO, R.; SADEGUI, S.; BLASCO, E. et al. Effect of chamber characteristics, loading and analysis time on motility and kinetic variables analysed with the CASA-mot system in goat sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, v.177, p.97-104, 2017.

FARREL, P.B.; FOOTE, R.H.; MCARDLE, M.M. et al. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA). *J. Androl.*, v.17, p.293-300, 1996.

FARREL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, CC. et al. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted Sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, v.49, p.871-879, 1999.

GĄCZARZEWICZ, D. Influence of chamber type integrated with computer-assisted semen analysis (CASA) system on the results of boar semen evaluation. *Pol. J. Vet. Sci.*, v.18, p.817-824, 2015.

GIARETTA, E.; MUNERATO, M.; YESTE, M. et al. Implementing an open-access CASA software for the assessment of stallion sperm motility: Relationship with other sperm quality parameters. *Anim. Reprod. Sci.*, v.176, p.11-19, 2017.

GLORIA, A.; CARLUCIO, A.; CONTRO, A. et al. 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. et al. Influence of counting chamber type on CASA outcomes of equine semen analysis. *Equine Vet. J.*, v.44, p.542-549, 2012.

KATZ, D.F.; DAVIS, R.O.; DELANDMETER, B.A. et al. Real-time analysis of sperm motion using automatic video image digitization. *Comput. Methods Programs Biomed.*, v.21, p.173-182, 1985.



- KRAEMER, M.; FILLION, C.; MARTIN-PONT, B. *et al.* Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Hum. Reprod.*, v.13, p.611-619, 1998.
- LE LANNOU, D.; GRIVEAU, J.F.; LE PICHON, J.P. *et al.* Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in semen or in capacitating medium. *Hum. Reprod.*, v.7, p.1417-1421, 1992.
- 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. *Biol. Reprod.*, v.38, p.270-281, 1988.
- 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. *Hum. Reprod.*, v.11, p.304-310, 1996.
- MORTIMER, D.; GOEL, N.; SHU, M.A. Evaluation of the CellSoft automated semen analysis system in a routine laboratory setting. *Fertil. Steril.*, v.50, p.960-968, 1988.
- MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update*, v.3, p.403-439, 1997.
- MORTIMER, S.T. CASA - practical aspects. *J. Androl.*, v.21, p.515-524, 2000.
- OWEN, D.H.; KATZ, D.F. Sperm kinematic analysis. *J. Androl.*, v.14, p.210-221, 1993.
- QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; RIGAU, A.T. *et al.* Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, v.59, p.1973-1990, 2003.
- R CORE team. R: a language and environment for statistical computing. r foundation for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2015. Available in: <<http://www.R-project.org>>.
- RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D. *et al.* Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*, v.60, p.1553-1568, 2003.
- 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. *Anim. Reprod. Sci.*, v.102, p.1-13, 2007.
- SILVA, M.C.; MOURA, L.C.M; MELO, M.I.V. *et al.* Prolonged post cooling but not pre-cooling equilibrium length improves the viability of ram sperm cryopreserved in an extender containing low-density lipoproteins. *Small Rumin. Res.*, v.119, p.88-95, 2014.
- UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; MUNDAY, R. *et al.* Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Anim. Reprod. Sci.*, v.51, 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.