



EMANUELE ALMEIDA GRICIO

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE TRÊS EXTENSORES NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO POR MEIO DA
ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE SÊMEN (CASA)**

**LAVRAS - MG
2021**

EMANUELE ALMEIDA GRICIO

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE TRÊS EXTENSORES NA CRIOPRESERVAÇÃO DE
SÊMEN BOVINO POR MEIO DA ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE SÊMEN (CASA)**

Relatório de estágio supervisionado
apresentado à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Curso de Medicina Veterinária para a
obtenção do título de Bacharel.

Professor Dr. João Bosco Barreto Filho
Orientador

LAVRAS - MG

2021

AGRADECIMENTOS

Segundo a psicologia, a construção do “eu” é contínua e se comporta como um mosaico, composto por experiências e conexões. Sou grata a todos, que de alguma forma, participaram da construção do meu.

Agradeço aos meus pais, primeiramente à minha mãe, a mulher mais incrível que conheço, a mais empática, que sempre esteve na primeira fila me assistindo e incentivando. Talvez seja a maior peça do meu mosaico, ela é a minha inspiração. E meu pai, ele é sinônimo de proteção e confiança, sempre soube que estaria segura com ele por perto, ou à distância de uma ligação. Vocês, meus irmãos e irmã dão sentido a tudo.

Agradeço aos meus avós maternos Adelina e José, por serem meu exemplo de conexão com a natureza. Aos meus avós paternos Geny e Geraldo (in memoriam) por todas as histórias sobre a área da saúde. Hoje, acredito que ter escolhido a medicina veterinária foi resultado da minha admiração por todos vocês.

Às minhas amigas de Jaboticabal por serem a prova de que amizades reais não dependem de presença física ou contatos semanais, mas sim de amor genuíno e cumplicidade, obrigada.

Às minhas irmãs da República Pira Saia, obrigada por serem meu lar, por todos os ensinamentos, por mostrarem que responsabilidade e lazer podem coexistir, e tornarem a rotina do dia a dia muito mais feliz.

Aos meus amigos da veterinária, Ana, Marina, Karol, Amanda, Thiago e Gabriel. Obrigada pela amizade, pelo companheirismo nas madrugadas de estudos e trabalhos, mas agradeço principalmente pelas risadas e cafés.

Agradeço ao Professor João Bosco Barreto Filho, meu orientador, pelo convite para fundação do grupo de estudos GESTAR, por todos os ensinamentos, conselhos e dedicação.

À toda a equipe da empresa IMV Technologies Brasil, muito obrigada pela confiança, pelos ensinamentos, amizades e por mostrarem que o ambiente de trabalho pode ser leve e acolhedor. Em especial, agradeço ao meu supervisor de estágio Pedro Nacib, pela confiança depositada em mim, por estar sempre disposto a

esclarecer dúvidas e oferecer desafios, aprendi muito com você. Agradeço também ao Fábio Francisco, por me explicar os parâmetros de motilidade obtidos pelo CASA e por ceder uma imagem muito explicativa.

Agradeço, pela assessoria ao meu orientador, na área de estatística, ao Professor João Domingos Scalon.

Agradeço aos animais, pois, ao tentar entendê-los aprendemos a observar, a escutar, criamos conexões e formas não verbais de comunicação. Muitas vezes observei profissionais sérios brincando com seus pacientes, conversando ou oferecendo carinho. Eles sim são nossos maiores mestres, sou grata por ter o privilégio de estudá-los.

E finalmente, agradeço à Universidade Federal de Lavras e aos docentes do Departamento de Medicina Veterinária pelo trabalho de excelência, por terem me proporcionado a estrutura necessária para que pudesse crescer acadêmica e pessoalmente.

Ontem promessa.
Amanhã probabilidade.
Hoje ação.

Ontem parecia.
Amanhã quem sabe?
Hoje sem dúvida.

Ontem anseio.
Amanhã mudança.
Hoje oportunidade.

Ontem foi.
Amanhã será.
Hoje é.

Ontem experiência adquirida.
Amanhã lutas novas.
Hoje, porém, é a nossa hora
de fazer e de construir.

Pelo Espírito Emmanuel
Chico Xavier

RESUMO

A Inseminação Artificial foi a primeira biotecnologia aplicada no mundo todo para melhoria da reprodução e genética animal. A criopreservação de sêmen se tornou ferramenta essencial para a ampla utilização e distribuição de doses de sêmen. A membrana plasmática é composta por lipídios e proteínas, regula funções diretamente relacionadas ao potencial de fertilidade. Fatores como, mudanças de temperatura, pressão osmótica, formação de cristais de gelo, estresse oxidativo, podem alterar a estrutura desta membrana e comprometer a fertilidade do espermatozoide. Os extensores, comumente chamados de diluentes, tem função de preservar a integridade celular durante o processo de criopreservação. Diluentes à base de gema de ovo são os mais utilizados como crioprotetores não penetrantes, porém, nos últimos anos a preocupação quanto a sua alta suscetibilidade a contaminação patogênica se tornou maior. Para substituí-lo, foram desenvolvidos diluentes à base de Lecitina e Lipossomos. Com o objetivo de esclarecer informações relativas ao efeito do diluente sobre a viabilidade espermática, utilizou-se o Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (CASA), para avaliar o desempenho de três diluentes comerciais no sêmen fresco, após descongelação e cinco horas após descongelação. Os resultados preliminares das análises mostraram que a eficiência dos extensores para manutenção da motilidade espermática total é semelhante.

Palavras-chave: Congelação de espermatozoides, extensores, lipossomos, lecitina, criopreservação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Equipamento IVOS II Hamilton Thorne, Inc.....	12
Figura 2 – Parâmetros individuais de cinética espermática obtidos através de análise CASA.....	13
Figura 3 – Desenho experimental em parcelas subdivididas.....	22
Figura 4 – Motilidade total do sêmen bovino fresco avaliada pelo CASA em relação ao uso de três diluentes.....	24
Figura 5 – Motilidade total do sêmen bovino avaliada pelo CASA em relação ao tempo (Boxplot).....	25
Figura 6 – Motilidade total do sêmen bovino avaliada pelo CASA em relação ao tempo com o uso de três diferentes diluentes.....	26
Figura 7 – Análise de variância (Anava) para motilidade total sem transformação logarítmica.....	26
Figura 8 – Normalidade dos dados, independência das variáveis e análise dos resíduos.....	27
Figura 9 – Análise de variância (Anava) para motilidade total após transformação logarítmica.....	28
Figura 10 – Motilidade total do sêmen bovino avaliada pelo CASA em relação ao uso de três diluentes.....	29
Figura 11 – Comparação entre os diferentes diluentes usados para a criopreservação do sêmen bovino e sua influência sobre a motilidade total avaliada pelo CASA.....	30
Figura 12 – Análise de variância (Anava) para motilidade total após transformação logarítmica para comparação da influência dos três diluentes comerciais em relação ao controle.....	30
Figura 13 – Normalidade, independência de variáveis e análise de resíduos, após transformação logarítmica dos dados.....	31

LISTA DE SIGLAS

ASBIA	Associação Brasileira de Inseminação Artificial
BSP	Proteínas do plasma seminal bovino
CASA	Sistema computadorizado para análise de sêmen
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
Hz	Hertz
IA	Inseminação artificial
mL	Mililitro
n	Número
OPU	Aspiração folicular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
STR	Retilinearidade
VAP	Velocidade média de percurso
VSL	Velocidade em linha reta
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1.	AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA	11
2.1.1.	SISTEMA COMPUTADORIZADO PARA ANÁLISE DE SÊMEN	12
2.1.1.1.	CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA	15
2.1.1.2.	MOTILIDADE ESPERMÁTICA	15
2.2.	PROCESSAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO	16
3.	O ESTÁGIO SUPERVISIONADO	20
4.	OBJETIVO	20
5.	MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1.	COLHEITA E PROCESSAMENTO DE SÊMEN	21
5.2.	ANÁLISE ESPERMÁTICA	22
5.2.1.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
7.	CONCLUSÃO	34
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
	ANEXO A – Abreviações e definições dos parâmetros de movimento determinados pelo CASA.	42
	ANEXO B - Parâmetros cinéticos e funções determinadas pelo CASA.	43
	ANEXO C – Parâmetros cinéticos de movimentação individual dos espermatozoides determinados pelo CASA.	44

1. INTRODUÇÃO

A visão da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) é permitir que todas as pessoas tenham acesso a alimentos nutritivos e administrar os recursos naturais de uma forma que mantenha o funcionamento dos ecossistemas, para apoiar as crescentes necessidades humanas (FAO, 2018). Portanto, é necessário desenvolver e aprimorar tecnologias que auxiliem no aumento da produtividade na pecuária, na otimização dos sistemas de criação e na rentabilidade do rebanho (BARUSELLI et al., 2019).

Historicamente a inseminação artificial (IA) foi a primeira biotecnologia amplamente empregada para melhoria da reprodução e genética bovinas (FOOTE, 2002). A IA é precedida por diversos processos que foram desenvolvidos e aperfeiçoados por pesquisadores do mundo todo. Basicamente consiste em colheita e processamento do ejaculado de um reprodutor geneticamente superior, obtenção de concentração ideal de espermatozoides para produção de doses inseminantes e, finalmente, a inseminação artificial através de inserção dos gametas diretamente no útero de múltiplas fêmeas.

A análise de sêmen é um teste laboratorial importante para estimar a fertilidade do macho, sendo importante também a associação a um exame clínico feito por um médico veterinário. Os resultados da análise são usados para atestar a saúde reprodutiva, determinar a adequação das doses de inseminação, diagnosticar causas específicas de infertilidade, orientar as decisões clínicas e de manejo (BRITO, 2016). Superestimar ou subestimar a concentração espermática pode comprometer a dose inseminante (REQUENA, 2013) e afetar o resultado. O objetivo é usar a menor quantidade de espermatozoides para atingir as taxas de fertilidade desejadas (FOOTE; KAPROTH, 1997) otimizando o uso de cada ejaculado.

De acordo com o mais recente relatório da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA), 5.021.074 doses de sêmen foram vendidas entre janeiro e março de 2021, valor 38,8% maior que o mesmo período de 2020 (ASBIA, 2021).

O uso do sêmen bovino criopreservado apresenta vantagens, em relação a outros métodos, pois além de prevenir a propagação de doenças, também possibilita a expansão genética para o comércio mundial (VERBERCKMOES et al., 2006). Durante o processo de criopreservação, o efeito osmótico, a temperatura e as mudanças morfológicas que ocorrem devido às mudanças na fluidez, permeabilidade e composição lipídica da membrana espermática levam à diminuição da viabilidade espermática (THOMAS et al., 1998). Desta forma, a interação entre as células espermáticas e o meio de diluição é um fator importante na manutenção da integridade e da capacidade de fertilização do espermatozoide.

O objetivo deste trabalho foi relatar atividades desenvolvidas durante estágio curricular na empresa IMV Technologies Brasil, com foco em informações relativas ao efeito do diluente sobre a viabilidade espermática e comparar o desempenho de três diluentes comerciais em diferentes momentos do processo de congelação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA

Várias técnicas podem ser utilizadas para a determinação da qualidade do sêmen. Macroscopicamente é possível avaliar o volume, pH, osmolaridade, viscosidade, cor, odor e densidade. A análise microscópica permite avaliar o movimento em massa, chamado de turbilhonamento, que é resultado da associação da concentração, a motilidade individual, estimada pelo percentual de células móveis e vigor espermático. O turbilhonamento é classificado subjetivamente pela observação de ondas na periferia da gota, com a escala variando entre zero e cinco (HENRY; ECHEVERRI, 2013).

Para determinação da concentração é comumente utilizada a câmara de Neubauer, realizando a contagem de células após diluição com volumes conhecidos de formol salina ou outra solução, técnica que demanda tempo e treinamento dos

técnicos de laboratório. Outra ferramenta comumente utilizada é o espectrofotômetro, que estima a concentração espermática pela absorvância de luz (REQUENA, 2013).

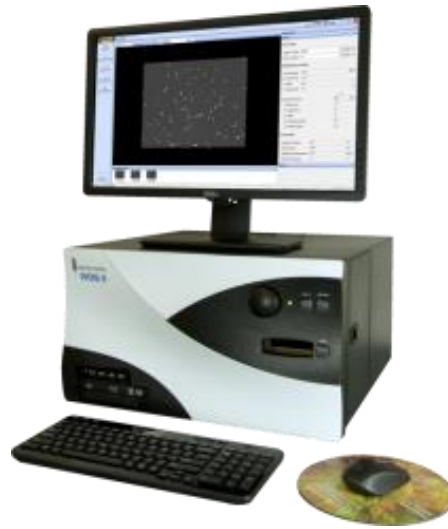
Na teoria a análise de sêmen é uma tarefa simples, porém, a obtenção de resultados precisos e confiáveis requer conhecimento sobre as diferentes técnicas e equipamentos envolvidos, especialização técnica e implementação de programas de garantia de qualidade (BRITO, 2016). De acordo com Amann (1989) a precisão de qualquer teste de laboratório será influenciada pela variação biológica, erro humano envolvido na execução do teste, desempenho dos instrumentos e pela variação matemática inerente associada à distribuição de "valores observados" para qualquer teste sobre "o valor verdadeiro".

2.1.1. SISTEMA COMPUTADORIZADO PARA ANÁLISE DE SÊMEN

O desenvolvimento da sistema computadorizado para análise de sêmen (CASA) durante a década de 1980 gerou grande empolgação, embora os sistemas fossem predominantemente pouco mais do que caixas pretas capazes de rastrear o movimento das células, com quase nenhuma padronização e verificação dos dados gerados (MORTIMER; VAN DER HORST; MORTIMER, 2015). Hoje, o CASA reduz significativamente as variações técnicas nos resultados das análises, e permite uma melhor discriminação das amostras do que a avaliação subjetiva (BRITO, 2010).

O Sistema CASA é composto por software com sistema Windows e hardware (Figura 1) composto por CPU, tela LCD, mouse, teclado, microscópio integrado com câmera digital. A mesa automática possui placa aquecedora integrada, que proporciona controle preciso da temperatura durante a análise. Além disso, possui configuração para o tipo de lâmina utilizada, como as lâminas descartáveis com altura fixa, sendo a altura/profundidade a distância entre a lamínula e a lâmina.

Figura 1 - Equipamento IVOS II Hamilton Thorne, Inc.

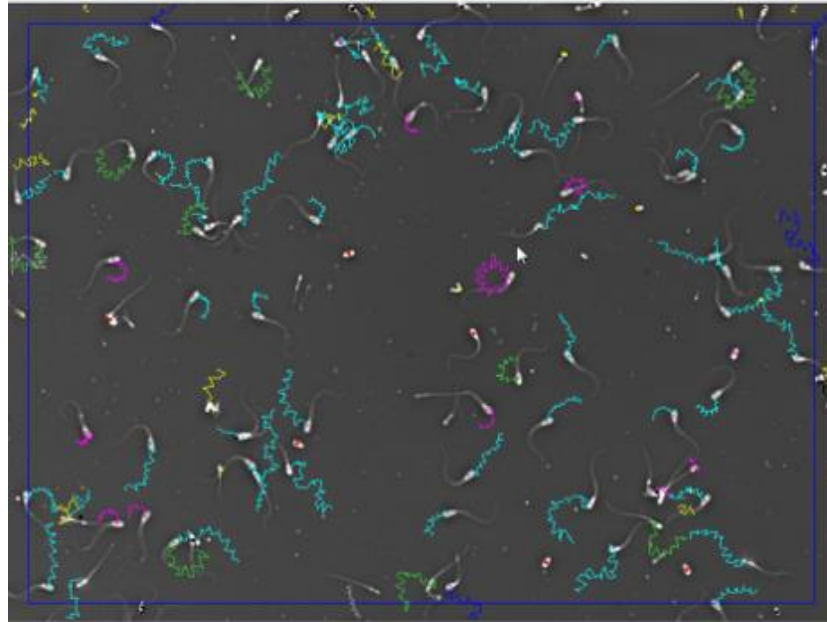


Fonte: Hamilton-Thorne (2017)

O tipo de lâmina de análise pode influenciar muito os resultados da análise espermática realizadas pelos Sistemas CASA (IBĂNESCU et al., 2016). A profundidade da câmara, por determinar a forma como os espermatozoides se movimentam, pode contribuir para diferenças entre os resultados de motilidade. Lâminas como a Leja, com profundidade de 20 μm , permitem movimentação espermática mais próxima ao natural (GAÇZARZEWICZ, 2015). Assim, é importante utilizar lâminas de qualidade, que ofereçam confiabilidade e precisão para a análise.

O sistema computadorizado visualiza e digitaliza o movimento das células espermáticas através da captura de uma série de imagens de campos aleatórios em uma velocidade de 30 ou 60 quadros ou *frames* por segundo (Figura 2). Assim, concentração espermática e seus parâmetros de motilidade, velocidade de movimento e morfologia são derivados para cada célula individualmente. A identificação e quantificação de subgrupos de espermatozoides com diferentes padrões de movimento é de grande importância para auxiliar na estimativa da fertilidade de amostras de sêmen bovino e fornece novos *insights* para programas de avaliação (MUIÑO et al., 2008).

Figura 2 - Parâmetros individuais de cinética espermática obtidos através de análise CASA.



Legenda: categorização de cinética espermática por cor: verde para móvel, ciano/azul claro progressivo, magenta/roxo lento, vermelho estático, azul escuro célula que saiu do campo durante os 10 primeiros frames (ou seja, após a captura das 10 primeiras imagens), amarelo começou a se movimentar após os 10 primeiros frames e cinza entrou no campo após os 10 primeiros frames.

Fonte: CASA IVOS II, Hamilton Thorne (2017).

Resultados semelhantes podem ser obtidos usando diferentes equipamentos CASA, em locais diferentes e a precisão de tais medições podem ser altas, através de calibração, protocolos e controle de qualidade (DAVIS; ROTHMANN; OVERSTREET, 1992). A análise é amplamente afetada pela precisão das diluições preparadas, por problemas com as lâminas (lascas e arranhões), uso incorreto da lamínula, preenchimento inadequado (sobrecarga ou subcarga, presença de bolhas de ar), fórmulas de cálculo erradas e número insuficiente de espermatozoides por campo (BRITO, 2016). É extremamente importante que os protocolos sejam seguidos em todos os laboratórios e, isso sendo feito, os resultados de um laboratório poderão ser comparados aos de outros (FARRELL et al., 1995).

2.1.1.1. CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA

A determinação precisa da concentração de espermatozoides em um ejaculado é componente importante do espermograma e necessário para o cálculo de doses a serem produzidas (DOUGLAS-HAMILTON et al., 2005). O número de espermatozoides necessários para a IA obter potencial máximo de fertilidade, considerando o mérito genético de um touro e outros fatores, é um dos elementos mais importantes em um programa de melhoramento (FOOTE; KAPROTH, 1997)

O software utiliza o mesmo conceito de identificação individual de cada célula, garantindo alta sensibilidade na análise e alta correlação e concordância com a contagem usando a câmara de Neubauer (CRESPILHO et al., 2017). A realização da diluição antes da análise tem como objetivo a visualização de todas as células presentes no campo e correta detecção de suas trajetórias (CONTRI et al., 2010). A superlotação do campo pode resultar em erro de identificação de trajetória devido a colisões. Esses erros são mínimos para a concentração ≤ 30 milhões/mL mas tornam-se cada vez mais significativos à medida que a concentração aumenta (CONTRI et al., 2010; HAMILTON-THORNE, 2017).

2.1.1.2. MOTILIDADE ESPERMÁTICA

Temperatura da amostra, meio de diluição, concentração de amostra, número de frames, tipo de câmara e número de campos demonstraram afetar os resultados de motilidade (BRITO, 2010). O sistema caracteriza uma célula espermática como móvel quando esta se move a uma distância maior que o comprimento de sua cabeça entre o primeiro e o último frame, o que é traduzido pelo parâmetro *average path velocity (VAP)* ou velocidade média de percurso. Assim como utiliza outros parâmetros para caracterização de células lentas, estáticas, entre outros (Anexo A).

A velocidade em linha reta (VSL) é a distância entre o primeiro e o último ponto no trajeto do espermatozoide, dividida pelo tempo percorrido. As populações de espermatozoides progressivos são baseadas na divisão da VSL pela VAP, onde

obtém-se a retilinearidade (STR), os parâmetros (Anexo B) são definidos pelo *setup* utilizado (BRITO, 2010).

Ainda não há um consenso ao afirmar a confiabilidade na definição de fertilidade através da motilidade. No entanto, espermatozoides com movimento baixo ou alterado têm pouca probabilidade de atingir a tuba uterina, é razoável presumir que quanto maior o número de espermatozoides com motilidade progressiva, maior a chance de um deles atingir a tuba uterina (MUIÑO et al., 2008; OLDS-CLARKE, 1996).

2.2. PROCESSAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO

Antes da otimização do procedimento de congelação e descongelação, a IA era realizada apenas com sêmen fresco. O primeiro problema a ser resolvido era preservar o sêmen por mais tempo, o que permitiria seu transporte e utilização no campo (FOOTE, 2002). A criopreservação permite que o sêmen seja armazenado por prazo indeterminado em botijões de nitrogênio líquido à -196°C . Entretanto, esse processo pode resultar em menores taxas de fertilidade em relação ao sêmen fresco (BERTOL et al., 2014).

Vários fatores podem causar estresse à célula espermática, dentre eles, mudanças de temperatura, pressão osmótica e toxicidade causada pela exposição a concentrações molares de crioprotetores; pode ocorrer também a formação e dissolução de gelo no ambiente extracelular (WATSON, 2000). Para que a técnica seja considerada eficiente é necessário que características como motilidade progressiva, metabolismo e integridade de membrana sejam mantidas dentro de valores aceitáveis.

Diluentes para criopreservação são substâncias que contém basicamente: água ultrapura, crioprotetores, substâncias tampão (proteção contra a variação de pH), fonte de energia e antibióticos (HENRY; ECHEVERRI, 2013), tem função de manter a viabilidade da célula.

Os crioprotetores podem ser classificados como penetrantes e não penetrantes, de acordo com a sua capacidade de penetrar através da membrana

plasmática (CELEGHINI, 2005). Os penetrantes são pequenas moléculas que atuam no meio intracelular e extracelular (SZTEIN et al., 2001), tem ponto de congelação muito mais baixo que o da água, permitindo que durante a formação dos cristais de gelo os espermatozoides fiquem protegidos nos canais do diluidor não congelado (CELEGHINI, 2005). Já os não penetrantes são macromoléculas com alto peso molecular, atuam somente no meio extracelular, promovendo a movimentação de água para fora da célula, assim, evitando a formação de gelo intracelular (FERREIRA, 2008).

A membrana plasmática é composta por agregados de lipídios e proteínas organizados, regula um grande número de funções espermáticas diretamente relacionadas ao potencial de fertilidade (SINGH et al., 2018). Para que as membranas plasmáticas desempenhem sua função é requisito que estejam em estado líquido (CELEGHINI, 2005). Layek et al., (2016) reforçam que o processo de congelação causa alterações na estrutura destas membranas, além de provocar um aumento do estresse oxidativo nas células espermáticas devido à peroxidação lipídica da membrana durante o processo de congelação, o que leva à produção de oxidantes, como espécies reativas de oxigênio (EROs), aumento da fragmentação do DNA e ruptura das estruturas fosfolipídicas da membrana plasmática, que podem induzir capacitação prematura ou exocitose acrossomal.

Mesmo nas melhores e mais adequadas condições de colheita, o sêmen fresco apresenta contaminação microbiana, geralmente entre 150.000 e 650.000 microrganismos / mL. Na monta natural a secreção cervical desempenha efeito bactericida, porém, na IA o sêmen é depositado diretamente no útero, o que pode facilitar infecções e outras enfermidades (CARVALHO et al., 2012). Portanto, é imprescindível a adição de antibióticos aos diluentes.

A interação entre as células espermáticas e o diluente representa um fator crucial para a preservação da integridade celular e sucesso da fertilização após congelação e descongelação (CHAVEIRO et al., 2006; SINGH et al., 2018). Portanto, selecionar o diluente ideal é essencial para minimizar os danos e manter a capacidade de fertilização dos espermatozoides (BERTOL et al., 2014).

2.2.1. GEMA DE OVO

De acordo com Foote (2002), o primeiro diluente de sêmen foi produzido à base de gema de ovo e fosfato, posteriormente adicionado citrato de sódio para dispersão dos glóbulos de gordura. Este diluente foi utilizado mundialmente, possibilitava o armazenamento do ejaculado à 5°C por mais de três dias. Foram, também, os primeiros crioprotetores a oferecer motilidade adequada pós descongelação e níveis de fertilidade aceitáveis para utilização comercial (LAYEK et al., 2016)

Atualmente a gema de ovo ainda é comumente utilizada para criopreservação de sêmen, atua como um reservatório de fosfolipídios, colesterol e ajuda a proteger a membrana plasmática e acrossoma contra lesões relacionadas à temperatura (SWELUM et al., 2018). Além disso, segundo Manjunath (2012), o sêmen bovino contém altas concentrações de proteínas Proteínas do plasma seminal bovino (BSP), que são responsáveis por modificações nas camadas lipídicas durante a capacitação espermática, porém, quando o sêmen é armazenado, estas proteínas exercem papel deletério ao retirarem esta camada. A gema de ovo contém proteínas de baixo peso molecular (LDL). As LDL criam ligação com as proteínas BSP, o que diminui a perda lipídica e aumenta a proteção espermática durante o armazenamento (MANJUNATH, 2012).

Nos últimos anos tem havido uma tendência contra o uso de gema de ovo em diluentes de sêmen, devido aos riscos sanitários (LEITE et al., 2010), tais como o potencial de disseminação de bactérias como o *Mycoplasma* sp. através do comércio de doses. Além disto, a contaminação pode ser fonte de endotoxinas e metabólitos capazes de prejudicar a capacidade fertilizante dos espermatozoides (BOUSSEAU et al., 1998; LAYEK et al., 2016).

2.2.2. LECITINA

Compostos relacionados à soja, especialmente a lecitina de soja, surgiram como substitutos eficazes para a gema de ovo por não serem de origem animal

(MIGUEL-JIMENEZ et al., 2020) e é basicamente uma mistura natural de fosfatidil colina e vários ácidos graxos, como esteárico, oleico e palmítico (CHAUDHARI et al., 2015). A concentração ideal de lecitina de soja no diluente é um pré-requisito para a proteção dos espermatozoides. Concentrações abaixo ou acima do ideal podem ser prejudiciais (CHAUDHARI et al., 2015).

2.2.3. LIPOSSOMOS

A composição diversa e variável de partículas na gema de ovo torna difícil o controle de qualidade do sêmen, problema apresentado por Bousseau et al., (1998). Investigações das porções de lipídios e lipoproteínas da gema de ovo indicam que é especificamente a porção de fosfolipídios que fornece proteção aos espermatozoides durante o resfriamento (QUINN; CHOW; WHITE, 1980).

Segundo Moussa et al., (2002) a ultracentrifugação com gradiente de densidade tem sido geralmente usada para a purificação de LDL, resultando em excelente pureza. No entanto, é muito demorada e as quantidades extraídas são muito pequenas para serem consideradas para uso comercial. Hoje, a obtenção dos lipossomos se dá através de técnicas de solubilização e esterilização de lipídios polares da gema do ovo, o que permite produção em escala industrial.

Os lipossomos têm composição semelhante à das membranas celulares e aderem às células durante a criopreservação, garantindo a troca de colesterol e fosfolipídios. Estas estruturas são essenciais para função e fluidez de membrana (MANJUNATH, 2012; MUTALIK et al., 2014). São quimicamente padronizados, calibrados, esterilizados para cumprir todos os requisitos de biossegurança e, portanto, prontos para uso (SINGH et al., 2018).

3. O ESTÁGIO SUPERVISIONADO

O estágio foi realizado na empresa IMV Technologies. Fundada em 1963, hoje o grupo francês é líder mundial em tecnologias reprodutivas, com atividades nos setores veterinário e humano. A subsidiária brasileira tem sua sede em Campinas-SP, possui infraestrutura completa, com escritório, laboratório de assistência técnica, laboratório para análises e estoque com câmara fria.

O supervisor de estágio foi o Médico Veterinário Pedro Nacib Jorge Neto, Diretor Técnico Comercial da IMV Brasil e o orientador Professor Dr. João Bosco Barreto Filho.

3.1. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

A IMV Technologies oferece soluções completas para inseminação artificial, transferência de embriões, OPU, análise de sêmen, equipamentos para centrais e ultrassonografia. O setor técnico-comercial é responsável pelo suporte técnico-científico, assim, busca embasamento científico para sanar dúvidas e promover o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas.

Periodicamente são realizadas diversas análises de sêmen e o equipamento mais utilizado hoje na rotina da empresa é o CASA – IVOS II. O treinamento para utilização deste equipamento foi realizado por vídeo conferência por técnicos certificados pela fabricante Hamilton Thorne. As análises podem ser conduzidas dentro do laboratório da empresa ou em conjunto com universidades, centrais de processamento de sêmen e empresas parceiras.

4. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi relatar atividade desenvolvida durante estágio obrigatório, disciplina PRG-107, no setor técnico-comercial da empresa IMV

Technologies Brasil. Optou-se, como tema para análise e discussão, pela descrição de informações relativas ao efeito de diferentes diluentes sobre a viabilidade espermática e comparação do desempenho de três diluentes comerciais em diferentes momentos do processo de criopreservação, através da avaliação de aspectos cinéticos do sêmen como a motilidade total, realizada em equipamento CASA – IVOS II.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. COLHEITA E PROCESSAMENTO DE SÊMEN

A colheita de sêmen dos touros (n=6) foi realizada com a utilização de vagina artificial. O volume de cada ejaculado foi obtido através da pesagem (1mL=1,05g) do ejaculado.

A avaliação inicial dos ejaculados ocorreu logo após colheita, foram obtidos os parâmetros do sêmen com diluição em solução Tampão Salina Fosfatada modificada por Dulbecco (DMPBS; Reprodux Laboratórios), buscando adequar a concentração para correta análise no CASA e minimizar a influência do meio na cinética dos espermatozoides.

Imediatamente após a análise, três alíquotas iguais do ejaculado foram retiradas do tubo de colheita e depositadas em três novos tubos tipo Falcon. Foram utilizados três diferentes diluentes comerciais: Tratamento I – Diluente a base de Lecitina, Tratamento II – Diluente a base de Gema de ovo e Tratamento III – Diluente a base de Lipossomos. Após a diluição foram retiradas alíquotas de 50µL de cada tratamento para análises computadorizadas (tempo T0).

Então, os tratamentos foram equilibrados à 4°C por quatro horas, segundo procedimento descrito por Leite et al., (2010), com a finalidade de se obter maior preservação da motilidade total e progressiva, bem como da integridade das membranas plasmáticas e acrossomais durante a criopreservação.

Em seguida, as amostras de sêmen foram envasadas em palhetas finas de 0,25mL (Ref: 005565; IMV Technologies) com auxílio da envasadora de sêmen Isevo (IMV Technologies) individualmente identificadas por touro e grupo de tratamento. As palhetas foram então distribuídas em *racks* de congelação (Ref: 007120; IMV Technologies) e acondicionadas na congeladora programável Digitcool (IMV Technologies) e criopreservadas utilizando a curva padrão para congelação de sêmen bovino ($-5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$; $-40\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$; e $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$) indicada pela fabricante. Posteriormente as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criogênico à -196°C até a utilização.

5.2. ANÁLISE ESPERMÁTICA

As análises foram realizadas utilizando o equipamento CASA IVOS II (Hamilton Thorne) através do *software Animal Breeder II* (versão 1.11.9; Hamilton Thorne). Foi utilizado o *setup* Bull Zeiss 10x NH BBVP, tendo como parâmetros para detecção de células e detecção de espermatozoides móveis totais: Tamanho máximo de cabeça = $85\text{ }\mu\text{m}^2$ e Tamanho mínimo de cabeça = $4\text{ }\mu\text{m}^2$; parâmetros cinéticos para progressivo STR = 80%; Progressivo VAP = $45\text{ }\mu\text{m}/\text{s}$; Lento VAP = $20\text{ }\mu\text{m}/\text{s}$; Lento VSL = $5\text{ }\mu\text{m}/\text{s}$; Estático VAP = $4\text{ }\mu\text{m}/\text{s}$ e Estático VSL = $1\text{ }\mu\text{m}/\text{s}$; A altura da lâmina Leja foi corrigida para $20,45\text{ }\mu\text{m}$, conforme certificado de análise de qualidade.

Três momentos foram estabelecidos para avaliações cinéticas do sêmen. O Tempo 0 (T0) é caracterizado pela análise das doses imediatamente após colheita e diluição; 35 dias após, as doses foram descongeladas a 37°C por cinco minutos em descongelador de sêmen (Ref: 450001; IMV Technologies Brasil) e avaliadas após a descongelação (T1); as amostras foram incubadas a 37°C por cinco horas e reavaliadas no CASA (T2).

Após os cinco minutos da descongelação todo o conteúdo de cada palheta (uma de cada tratamento) foi depositado com o auxílio de mandril em um tubo *ependorf* de 2mL, previamente identificado e aquecido em bloco de aquecimento sobre mesa aquecedora à 37°C . Uma alíquota de $50\mu\text{L}$ de cada amostra foi

depositada em outro *eppendorf* contendo 100 μ L dos respectivos diluentes e homogeneizadas com auxílio de vórtex.

Após dois minutos de incubação à 37°C, uma alíquota de 3 μ L foi depositada em poço da lâmina Leja (Leja 4 poços, 20 μ m; Ref: 025107; IMV Technologies) pré-aquecida na mesa aquecedora automatizada do IVOS II. Oito campos foram capturados (T1). Para análise T2, os *eppendorfs* com as amostras utilizadas no T1 foram incubadas em bloco de aquecimento por cinco horas à 37°C.

O mesmo diluente utilizado para a criopreservação do sêmen foi utilizado nas avaliações, para evitar os efeitos do estresse osmótico que os espermatozoides sofrem durante a descongelação, como descrito por Contri et al., (2010).

5.2.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado um desenho experimental com delineamento em blocos casualizados, arranjo em parcelas subdivididas e tratamento em fatorial (Figura 3). Uma matriz de dados exportados pelo CASA foi plotada no Rstudio® (versão 4.1.0). Realizou-se análise de variância e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey nível de significância de 0,05.

Figura 3 - Desenho experimental em parcelas subdivididas.

Fonte de Variação (FV)	Graus de liberdade (GL)
Parcela	17
Bloco	05
Diluyente (D)	02
Erro (a)	10
Subparcela	53
Tempo (T)	02
D x T	04

Erro (b)	30
----------	----

Fonte: Do autor (2021).

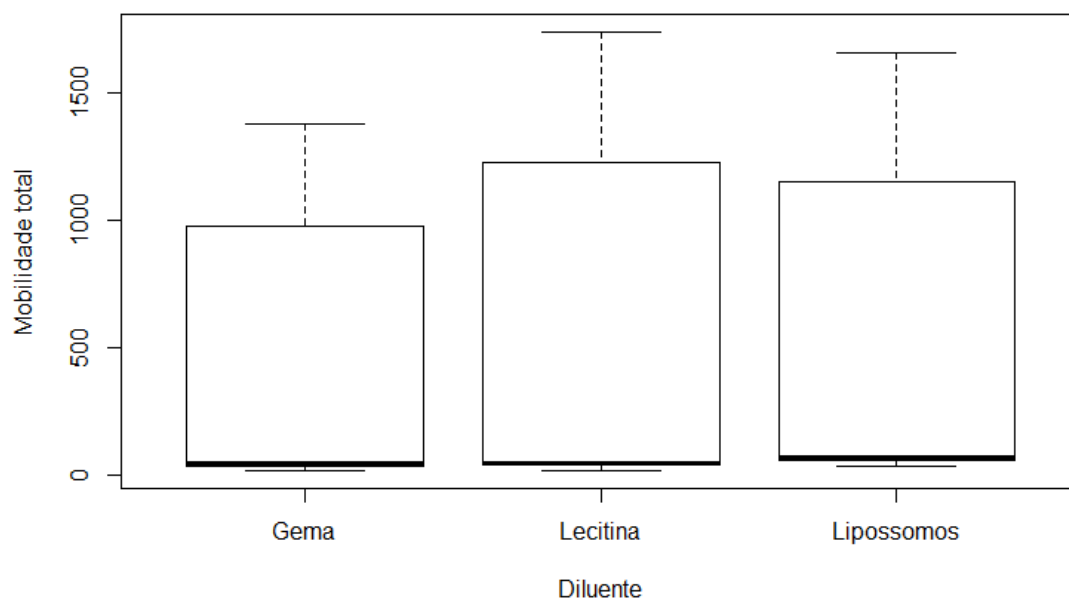
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados preliminares desta análise, ainda em andamento, são descritos a seguir, quando foram avaliados apenas os efeitos dos diluentes na variável motilidade total dos espermatozoides, expressa em milhões de células móveis/mL, obtida pela análise computadorizada. Os demais parâmetros cinéticos, assim como os morfológicos, oportunamente serão analisados.

Foi realizada uma análise exploratória de dados referente à influência dos diluentes usados em relação a parâmetros cinéticos de espermatozoides de sêmen bovino fresco, imediatamente após a descongelação e incubação à 37°C por cinco horas.

Na figura 4, os valores de motilidade total (concentração de espermatozoides móveis – Milhões/mL) em relação ao uso dos três diferentes diluentes podem ser observados.

Figura 4 - Motilidade total do sêmen bovino fresco avaliada pelo CASA (concentração de espermatozoides móveis – Milhões/ml) em relação ao uso de três diluentes.

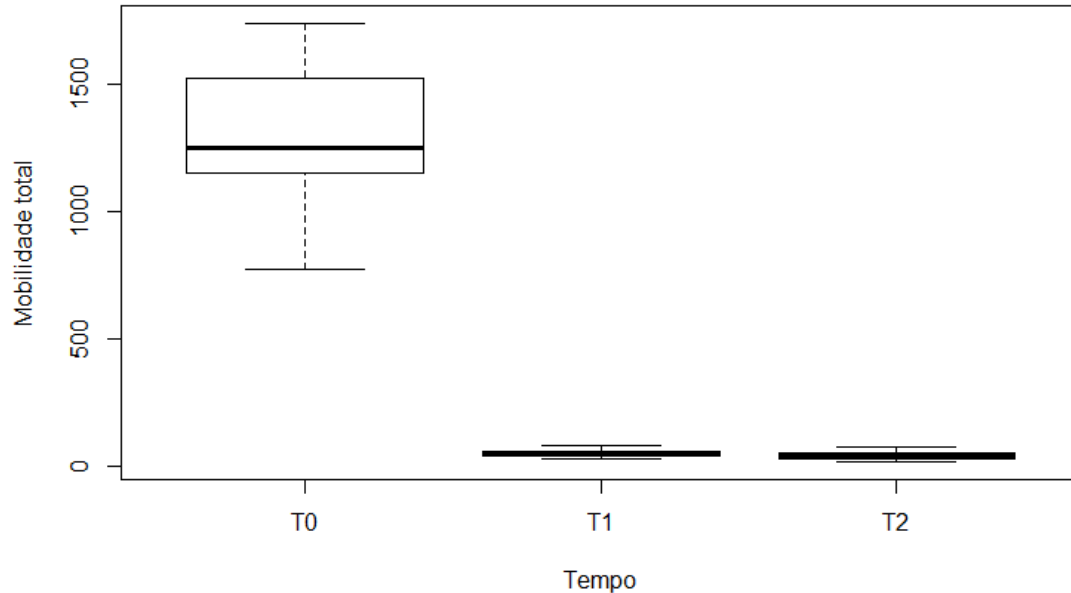


Fonte: Do autor (2021).

Observa-se que, no sêmen fresco, o efeito do diluente sobre a motilidade total de células foi muito semelhante e não apresentou diferença significativa. Trabalhos realizados por Miguel-Jimenez et al., (2020) mostraram que a motilidade total apresentou correlação positiva com a porcentagem de espermatozoides vivos e com menor ruptura de membrana lipídica. Desta forma, os resultados deste estudo mostram que qualquer um dos diluentes testados não prejudica a viabilidade espermática e nem apresenta efeito citotóxico ao sêmen a fresco, avaliado indiretamente pela cinética espermática, podendo ser usados como agentes crioprotetores em sêmen fresco.

Na figura 5, pode ser verificado o decréscimo de motilidade após a congelação das amostras, onde T0 representa a motilidade total pré-congelação, T1 a motilidade logo após descongelação e T2 cinco horas após a primeira análise.

Figura 5 - Motilidade total do sêmen bovino avaliada pelo CASA (concentração de espermatozoides móveis – Milhões/ml) em relação ao tempo (Boxplot).



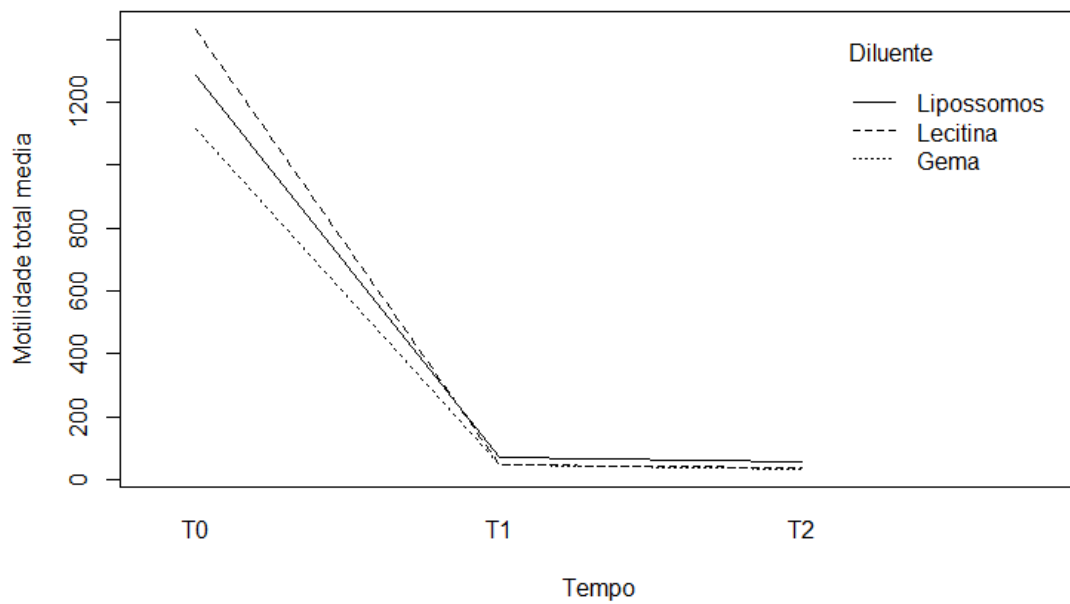
Legenda: T0: Sêmen fresco; T1: Imediatamente após descongelação; T2: cinco horas após descongelação.

Fonte: Do autor (2021).

Verifica-se um decréscimo drástico da motilidade total dos espermatozoides do tempo T0 para T1 e T2, decorrente do processo de congelação. Valores consideravelmente reduzidos para a motilidade espermática após a criopreservação do sêmen, em relação ao sêmen fresco, também foi relatado por outros autores (CHAUDHARI et al., 2015).

Na figura 6 o decréscimo de motilidade pode ser melhor observado, em relação ao tempo de congelação e diferentes diluentes.

Figura 6 - Motilidade total do sêmen bovino avaliada pelo CASA em relação ao tempo com o uso de três diferentes diluentes.



Legenda: T0: Sêmen fresco; T1: Imediatamente após descongelação; T2: cinco horas após descongelação.

Fonte: Do autor (2021).

A figura 7 mostra a ANAVA para as variáveis estudadas:

Figura 7 – Análise de variância (Anava) para Motilidade total sem transformação logarítmica

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Touro	5	198459	39692	2.049	0.0923 .
Diluyente	2	106996	53498	2.762	0.0752 .
Tempo	2	18134120	9067060	468.136	<2e-16 ***
Diluyente:Tempo	4	198865	49716	2.567	0.0527 .
Resíduos	40	774738	19368		

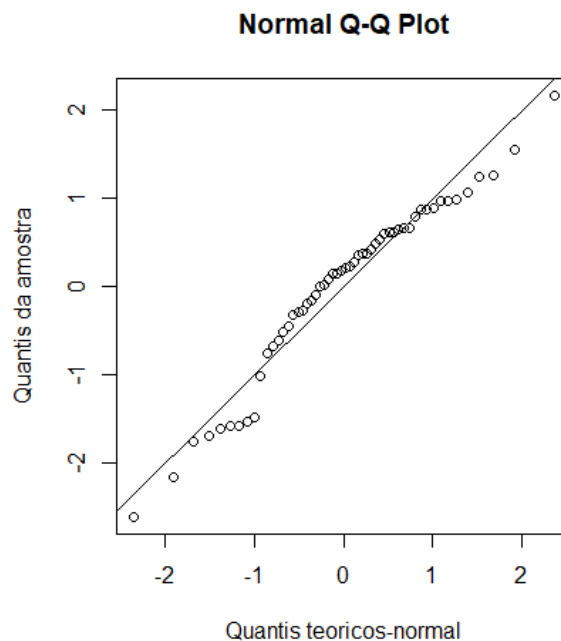
 Significância: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 '.' 1

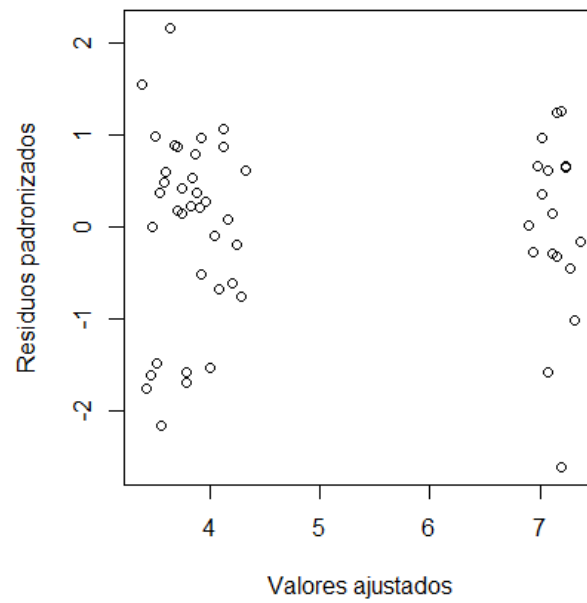
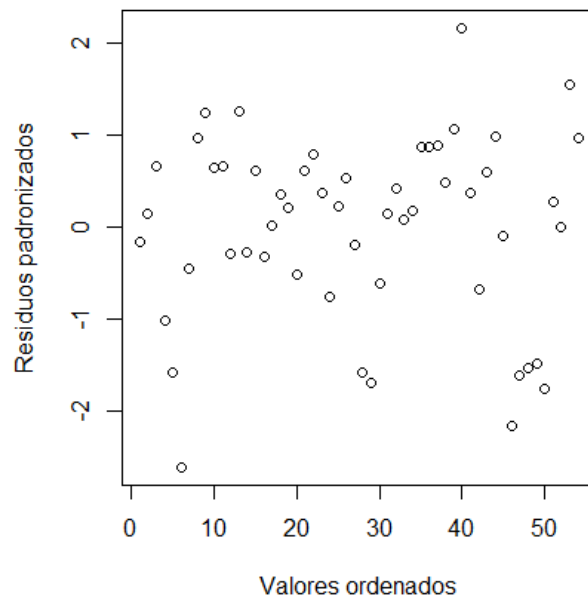
Fonte: Do autor (2021).

Observa-se nesta figura que apenas o efeito do tempo foi significativo para a variável motilidade espermática, considerando-se o sêmen fresco e os dois tempos de análise pós descongelação.

Entretanto, quando se faz o teste de normalidade da amostra, é aconselhável que se faça a transformação logarítmica pois a transformação normalizadora geralmente tem a propriedade de estabilizar as variâncias, ou seja, tornar os dados homocedásticos para cada grupo (com a mesma variância), pressuposto para qualquer análise paramétrica.

Figura 8 - *Plot* da normalidade dos dados, independência das variáveis e análise dos resíduos:





Fonte: Do autor (2021).

Diante destes resultados foi realizada a transformação dos dados. A figura 9 mostra a nova ANOVA para as variáveis estudadas:

Figura 9 - Análise de variância (Anava) para Motilidade total após transformação logarítmica

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Touro	1	0.28	0.28	5.187	0.027671	*
Diluyente	2	1.19	0.60	11.201	0.000117	***
Tempo	2	132.08	66.04	1240.071	< 2e-16	***
Diluyente:Tempo	4	0.66	0.17	3.101	0.024726	*
Resíduos	44	2.34	0.05			

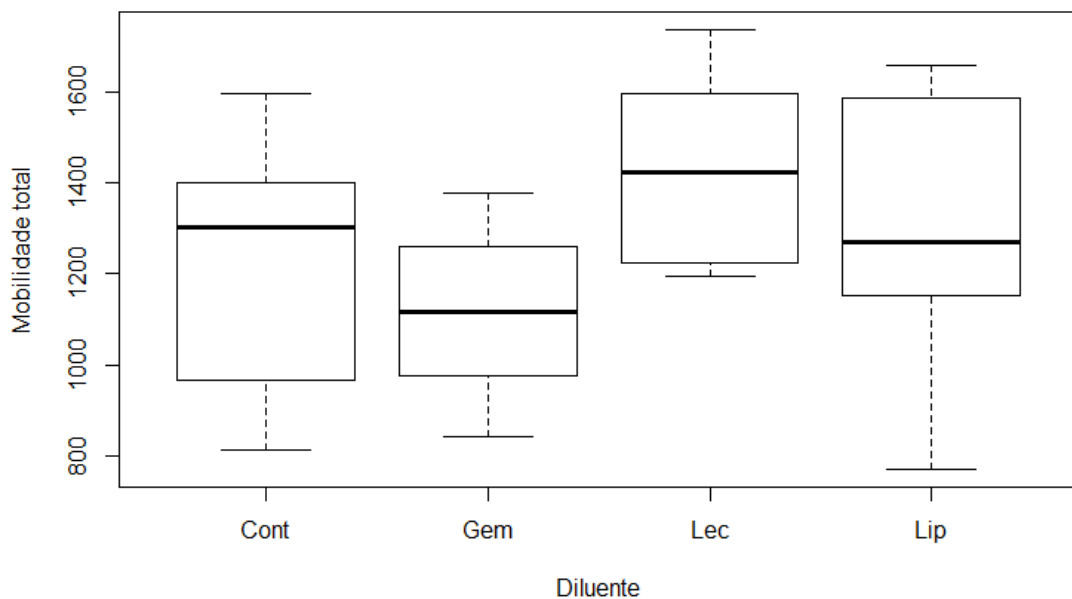
 Significância: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Fonte: Do autor (2021).

Neste novo cenário existe uma interação, significativa, entre diluyente e tempo, observa-se que o efeito touro também foi significativo.

A figura 10 mostra a influência dos diferentes diluentes na variável motilidade total do sêmen. Utilizando-se o PBS como controle.

Figura 10 - Motilidade total do sêmen bovino avaliada pelo CASA (concentração de espermatozoides móveis – Milhões/ml) em relação ao uso de três diluentes.

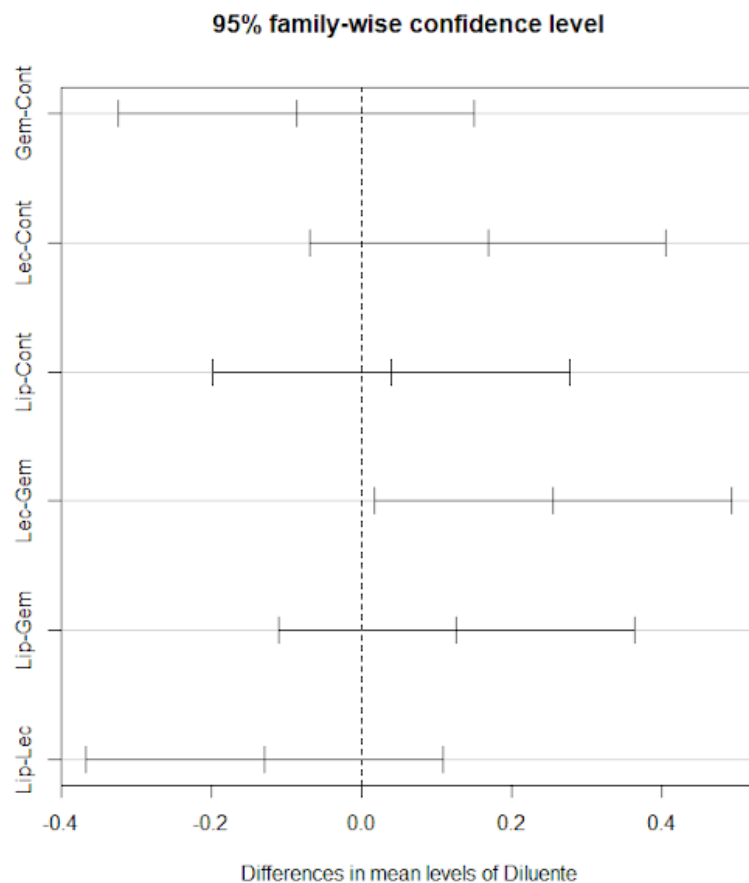


Legenda: Controle (PBS); Gem: Gema de ovo; Lec: Lecitina; Lip: Lipossomos.

Fonte: Do autor (2021).

Observa-se, preliminarmente, que a lecitina apresentou melhores resultados em relação ao uso de gema de ovo (Figura 9) e não diferiu do extensor à base de lipossomos. Resultados semelhantes foram relatados por Aires et al., (2003) e Singh et al., (2018). Por outro lado, Chaudhari et al., (2015) e Murphy et al., (2018) concluíram que o diluente à base de lipossomos fornece melhores resultados para crioproteção. No presente estudo, os resultados dos outros diluentes não diferiram, porém é necessário ainda o término das análises das interações, que foram significativas, para uma conclusão definitiva.

Figura 11 - Comparação entre os diferentes diluentes usados para a criopreservação do sêmen bovino e sua influência sobre a motilidade total avaliada pelo CASA.



Legenda: Controle (PBS); Gem: Gema de ovo; Lec: Lecitina; Lip: Lipossomos.

Fonte: Do autor (2021).

Figura 12 - Análise de variância (Anava) para motilidade total após transformação logarítmica para comparação de sêmen fresco com o controle (PBS) diluído em diferentes diluentes.

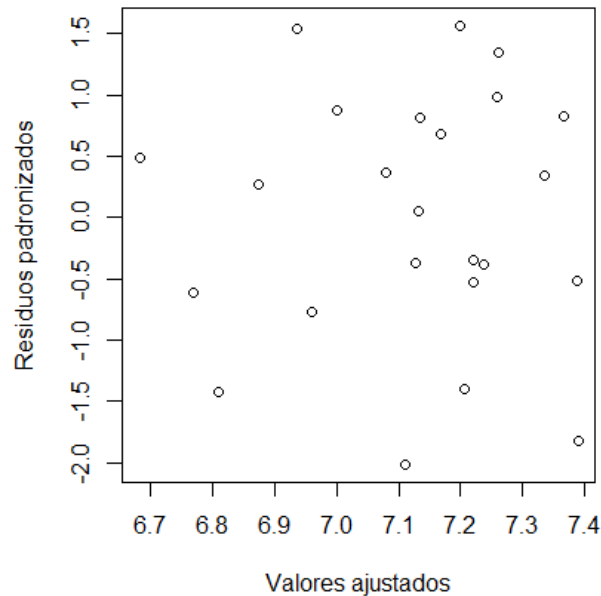
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Touro	5	0.6867	0.13734	6.747	0.00176	**
Diluyente	3	0.2025	0.06750	3.316	0.04882	*
Resíduos	15	0.3053	0.02035			

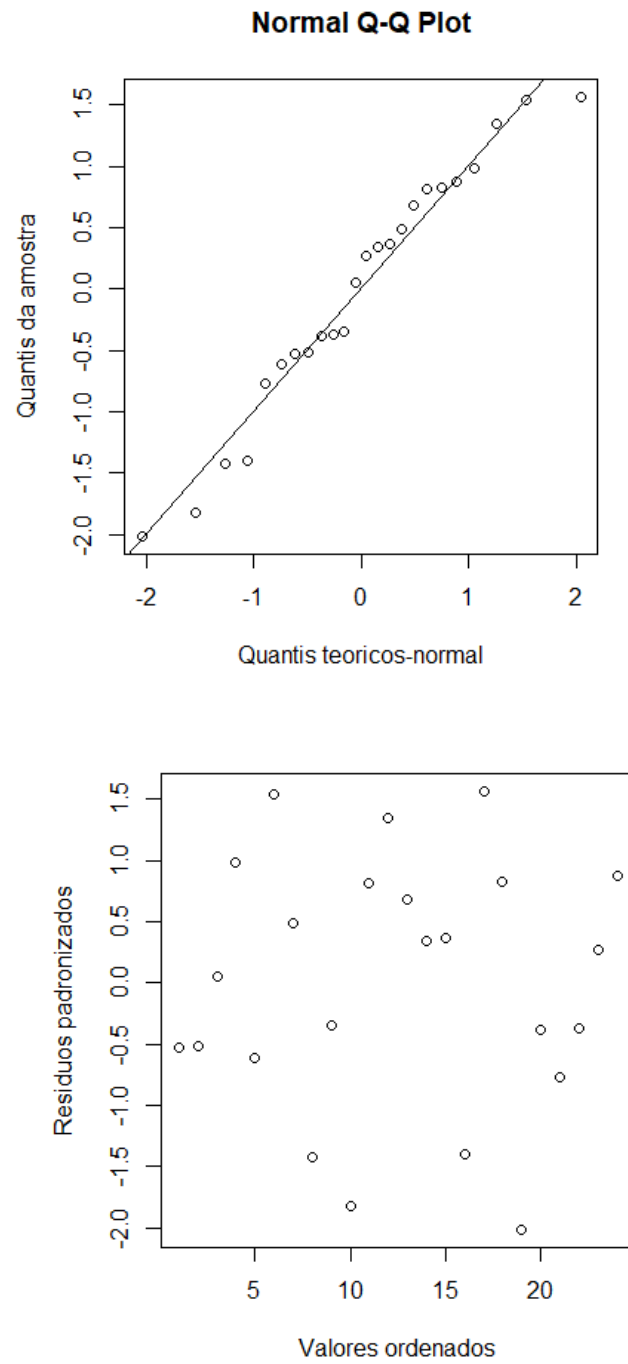
Significância: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Fonte: Do autor (2021).

Na Anava (Figura 12) observa-se que touro e diluyente têm efeito significativo ($p=0,001$ e $p=0,048$, respectivamente). Com essa nova análise (após transformação de dados) são obtidos padrões mais coerentes para normalidade, independência de variáveis e análise de resíduos, como se observa na figura 13.

Figura 13 - Normalidade, independência de variáveis e análise de resíduos, após transformação logarítmica dos dados.





Fonte: Do autor (2021).

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que diluentes à base de lipoproteínas vegetais como lecitina e lipossomos têm melhores resultados no processo de criopreservação em relação à motilidade total das células espermáticas do sêmen bovino quando comparados com extensor à base de gema de ovo.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerada como um parâmetro isolado, a motilidade total não oferece resultados que assegurem a fertilidade de amostras de sêmen e outras variáveis relacionadas à cinética espermática devem ser analisadas, como a motilidade progressiva, por exemplo. A conclusão das análises dos parâmetros cinéticos e morfológicos das amostras de sêmen utilizadas neste relatório tem que ser realizada, para serem estabelecidas conclusões definitivas. O estudo estatístico da normalidade, independência das variáveis e análise de resíduos nos parâmetros gerados pela análise computadorizada de sêmen deve ser considerado para se estabelecer análises de maior confiabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, Viviana A.; HINSCH, Klaus Dieter; MUELLER-SCHLOESSER, Frank; BOGNER, Katja; MUELLER-SCHLOESSER, Susanne; HINSCH, Elvira. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, [S. l.], v. 60, n. 2, p. 269–279, 2003. DOI: 10.1016/S0093-691X(02)01369-9.
- AMANN, RUPERT P. Can the Fertility Potential of a Seminal Sample Be Predicted Accurately?*. **Journal of Andrology**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 89–98, 1989. DOI: 10.1002/j.1939-4640.1989.tb00066.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.1939-4640.1989.tb00066.x>.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (ASBIA). **Index ASBIA - 1º trimestre 2021**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/wp-content/uploads/2021/05/Index-Asbia-1o-Trim-2021-Mídia.pdf>.
- BARUSELLI, Pietro Sampaio; LIMA, Bruna; CATUSSI, Chechin; ELLIFF, Flavia Morag; BATISTA, Emiliana Santana; CREPALDI, Gabriel Armond. Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, [S. l.], v. 43, p. 308–314, 2019.
- BERTOL, Melina Andrea Formighieri; WEISS, Romildo Romualdo; FUJITA, Aline Silva; KOZICKI, Luiz Ernandes; ABREU, Ana Claudia Machinski Rangel De; PEREIRA, João Filipi Scheffer. Dois diluentes comerciais na criopreservação de espermatozoides do epidídimo de touros. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 44, n. 9, p. 1658–1663, 2014. DOI: 10.1590/0103-8478cr20130747. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014000901658&lng=pt&tlng=pt.
- BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J. ..; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, [S. l.], v. 50, n. 5, p. 699–706, 1998. DOI: 10.1016/S0093-691X(98)00175-7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X98001757>.

BRITO, Leonardo F. C. Variations in Laboratory Semen Evaluation Procedures and Testing. *In: PROCEEDINGS OF THE 23 TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION & REPRODUCTION 2010, Anais [...]. [s.l: s.n.] p. 1–7.*

BRITO, Leonardo F. C. A multilaboratory study on the variability of bovine semen analysis. **Theriogenology**, [S. l.], v. 85, n. 2, p. 254–266, 2016. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.05.027. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.027>.

CARVALHO, A. F.; SARAGÓ, A.; AZEVEDO, S. S.; BATISTA, C. S. A.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E. Validação de nova proposta de espermocultura quantitativa aplicada a sêmen industrializado de touros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S. l.], v. 64, n. 1, p. 83–90, 2012. DOI: 10.1590/S0102-09352012000100013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352012000100013&lng=pt&tlng=pt.

CELEGHINI, Eneiva Carla Carvalho. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. Universidade de São Paulo, [S. l.], 2005. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-21092006-111358/publico/EneivaCarlaCarvalhoCeleghini.pdf>.

CHAUDHARI, D. V.; DHAMI, A. J.; HADIYA, K. K.; PATEL, J. A. Relative efficacy of egg yolk and soya milk-based extenders for cryopreservation (–196°C) of buffalo semen. **Veterinary World**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 239–244, 2015. DOI: 10.14202/vetworld.2015.239-244. Disponível em: <http://www.veterinaryworld.org/Vol.8/February-2015/20.html>.

CHAVEIRO, A.; MACHADO, L.; FRIJTERS, A.; ENGEL, B.; WOELDERS, H. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. **Theriogenology**, [S. l.], v. 65, n. 9, p. 1875–1890, 2006. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.10.017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X05004528>.

CONTRI, Alberto; VALORZ, Claudio; FAUSTINI, Massimo; WEGHER, Laura;

CARLUCCIO, Augusto. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Theriogenology**, [S. l.], v. 74, n. 3, p. 424–435, 2010. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.02.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.025>.

CRESPILHO, André Maciel; CHIARADIA, Livia; CORTEZ, Adriana; DINELLI, Marcela Vaz; PAPA, Frederico Ozanam; GOMES, Gustavo Mendes; PEIXOTO JÚNIOR, Kleber da Cunha. Avaliação da sensibilidade da técnica computadorizada de análise (CASA) para a determinação da concentração espermática do sêmen bovino congelado. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [S. l.], v. 54, n. 3, p. 247, 2017. DOI: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.127773. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/127773>.

DAVIS, Russell O.; ROTHMANN, Susan A.; OVERSTREET, James W. Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies**Presented at the Annual Meeting of the American Society of Andrology, Montreal, Quebec, Canada, April 27 to 30, 1991.††Supported in part by grants RO1-HD25907 and RO1-ES03614 . **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 57, n. 3, p. 648–653, 1992. DOI: 10.1016/S0015-0282(16)54915-2. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)54915-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(16)54915-2).

DOUGLAS-HAMILTON, Diarmaid H.; SMITH, Nancy G.; KUSTER, Christopher E.; VERMEIDEN, Jan P. W.; ALTHOUSE, Gary C. Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers. **Journal of Andrology**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 107–114, 2005. DOI: 10.1002/j.1939-4640.2005.tb02879.x.

FAO. Food and agriculture to achieve sustainable development goals. Roma, 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/3/l9900EN/i9900en.pdf>.

FARRELL, Paul; TROUERN-TREND, Victoria; FOOTE, Robert H.; DOUGLAS-HAMILTON, Diarmaid. 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**, [S. l.], v. 64, n. 1, p. 208–210, 1995. DOI: 10.1016/S0015-0282(16)57685-7. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)57685-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(16)57685-7).

FERREIRA, HEDER NUNES. **EFEITO DA EXPOSIÇÃO AOS CRIOPROTETORES GLICEROL E METILFORMAMIDA SOBRE A VIABILIDADE E FERTILIDADE DO**

SÊMEN EQÜINO. 2008. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”., [S. l.], 2008.

FOOTE, R. H. The history of artificial insemination : Selected notes and notables The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : The history of artificial insemination : Selected notes and notab. **Journal of Animal Science**, [S. l.], v. 80, p. 1–10, 2002. Disponível em: <http://www.zds-bonn.de/services/files/boarsemen2011/AI-History.pdf>.

FOOTE, R. H.; KAPROTH, M. T. Sperm Numbers Inseminated in Dairy Cattle and Nonreturn Rates Revisited. **Journal of Dairy Science**, [S. l.], v. 80, n. 11, p. 3072–3076, 1997. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76276-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030297762763>.

GAÇZARZEWICZ, 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**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 817–824, 2015. DOI: 10.1515/pjvs-2015-0106. Disponível em: <http://journals.pan.pl/dlibra/publication/114391/edition/99444/content>.

HAMILTON-THORNE. **HT CASA II Animal Breeder Software Manual** Beverly Hamilton Thorne, Inc, , 2017.

HENRY, Marc; ECHEVERRI, Ana Maria Loaiza. **Andrologia Veterinária Básica**. Belo Horizonte.

IBĂNESCU, Iulian; LEIDING, Claus; CIORNEI, Ștefan Gregore; ROȘCA, Petru; SFARTZ, Ioana; DRUGOCIU, Dan. Differences in CASA output according to the chamber type when analyzing frozen-thawed bull sperm. **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 166, n. 2015, p. 72–79, 2016. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2016.01.005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432016300033>.

LAYEK, S. S.; MOHANTY, T. K.; KUMARESAN, A.; PARKS, J. E. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 172, p. 1–9, 2016. DOI:

10.1016/j.anireprosci.2016.04.013. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.013>.

LEITE, Ticiano Guimarães; DO VALE FILHO, Vicente Ribeiro; DE ARRUDA, Rubens Paes; DE ANDRADE, André Furugen Cesar; EMERICK, Lucas Luz; ZAFFALON, Fabiane Gilli; MARTINS, Jorge André Matias; ANDRADE, Venício José De. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 120, n. 1–4, p. 31–38, 2010. DOI:

10.1016/j.anireprosci.2010.04.005. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432010000849>.

MANJUNATH, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. **Anim Reprod**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 809–815, 2012. Disponível em: [https://www.animal-](https://www.animal-reproduction.org/journal/animreprod/article/5b5a6053f7783717068b46cc)

[reproduction.org/journal/animreprod/article/5b5a6053f7783717068b46cc](https://www.animal-reproduction.org/journal/animreprod/article/5b5a6053f7783717068b46cc).

MIGUEL-JIMENEZ, Sara; RIVERA DEL ALAMO, Maria Montserrat; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, Manuel; HIDALGO, Carlos Olegario; PEÑA, Ana Isabel; MUIÑO, Rodrigo; RODRÍGUEZ-GIL, Joan Enric; MOGAS, Teresa. In vitro assessment of egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 215, n. February, p. 106315, 2020. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106315. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106315>.

MORTIMER, Sharon T.; VAN DER HORST, Gerhard; MORTIMER, David. The future of computer-aided sperm analysis. **Asian Journal of Andrology**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 545–553, 2015. DOI: 10.4103/1008-682X.154312.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. **Theriogenology**, [S. l.], v. 57, n. 6, p. 1695–1706, 2002. DOI: 10.1016/S0093-691X(02)00682-9. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X02006829>.

MUIÑO, R.; RIVERA, M. M.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; PEÑA, A. I. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and

motile sperm subpopulations structure of bull semen. **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 109, n. 1–4, p. 50–64, 2008. DOI:

10.1016/j.anireprosci.2007.11.028. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432007003946>.

MURPHY, E. M.; O'MEARA, C.; EIVERS, B.; LONERGAN, P.; FAIR, S. Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on in vitro sperm kinematics and in vivo fertility of frozen-thawed bull semen. **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 191, n. February, p. 70–75, 2018. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2018.02.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.010>.

MUTALIK, Srinivas; SALIAN, Sujith Raj; AVADHANI, Kiran; MENON, Jyothsna; JOSHI, Haritima; HEGDE, Aswathi Raju; KUMAR, Pratap; KALTHUR, Guruprasad; ADIGA, Satish Kumar. Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium.

Systems Biology in Reproductive Medicine, [S. l.], v. 60, n. 3, p. 183–188, 2014.

DOI: 10.3109/19396368.2014.902521. Disponível em:

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/19396368.2014.902521>.

OLDS-CLARKE, Patricia. How does poor motility alter sperm fertilizing ability?

Journal of andrology, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 183–6, 1996. DOI: 10.1002/j.1939-

4640.1996.tb01773.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8792208>.

QUINN, P. J.; CHOW, P. Y. W.; WHITE, I. G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **Journal of**

Reproduction and Fertility, [S. l.], v. 60, n. 2, p. 403–407, 1980. DOI:

10.1530/jrf.0.0600403.

REQUENA, Letícia Alecho. **PRINCIPAIS MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA EM CARNEIROS**. 2013. [S. l.], 2013.

SINGH, A. K.; KUMAR, A.; HONPARKHE, M.; KAUR, S.; KAUR, H.; GHUMAN, S. P. S.; BRAR, P. S. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of buffalo bull semen frozen in egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders.

Reproduction in Domestic Animals, [S. l.], v. 53, n. 1, p. 195–202, 2018. DOI:

10.1111/rda.13092.

SWELUM, Ayman Abdel Aziz; SAADELDIN, Islam M.; ALANAZI, Masad B.; BAWADH, Hani; AFIFI, Mohamed; ALOWAIMER, Abdullah N. Effects of adding egg yolks of different avian species to Tris glycerol extender on the post-thawing quality of buck semen. **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 195, p. 345–354, 2018.

DOI: 10.1016/j.anireprosci.2018.06.016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.016>.

SZTEIN, J. M.; NOBLE, K.; FARLEY, J. S.; MOBRAATEN, L. E. Comparison of Permeating and Nonpermeating Cryoprotectants for Mouse Sperm Cryopreservation. **Cryobiology**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 28–39, 2001. DOI: 10.1006/cryo.2001.2300.

Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224001923004>.

THOMAS, C. A.; GARNER, D. L.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Effect of Cryopreservation on Bovine Sperm Organelle Function and Viability As Determined by Flow Cytometry¹. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 58, n. 3, p. 786–793, 1998.

DOI: 10.1095/biolreprod58.3.786. Disponível em:

<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod58.3.786>.

VERBERCKMOES, Steven; SOOM, Ann Van; DEWULF, Jeroen; KRUIF, Aart De. Corrigendum to ““ Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen ”” [Theriogenology 63 (2005) 912 – 922]. [S. l.], v. 66, p. 2219, 2006. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.07.006.

WATSON, P. .. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 60–61, p. 481–492, 2000. DOI: 10.1016/S0378-

4320(00)00099-3. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432000000993>.

ANEXO A – Abreviações e definições dos parâmetros de movimento determinados pelo CASA.

Abreviação	Nome do parâmetro	Descrição resumida
VSL	Straight Line Velocity (Velocidade em Linha Reta)	A distância entre o primeiro e o último ponto no trajeto do espermatozoide, dividida pelo tempo decorrido, resulta na VSL.
VCL	Curvilinear Velocity (Velocidade Curvilínea)	A velocidade ao longo do trajeto do espermatozoide é medida pela soma da distância entre as posições da cabeça do espermatozoide em cada quadro, e a divisão pelo tempo decorrido.
VAP	Average Path Velocity (Velocidade de Percurso Médio)	O percurso médio é determinado com o nivelamento das posições da cabeça do espermatozoide em uma média de corrida. O comprimento do percurso resultante é determinado e dividido pelo tempo decorrido.
DSL	Distance Straight Line (Distância em Linha Reta)	A distância, em microns, percorrida pelo espermatozoide ao longo do percurso de VSL.
DCL	Distance Curvilinear (Distância Curvilínea)	A distância, em microns, percorrida pelo espermatozoide ao longo do percurso de VCL.
DAP	Distance Average Path (Distância do Percurso Médio)	A distância, em microns, percorrida pelo espermatozoide ao longo do percurso de VAP.
ALH	Amplitude of Lateral Head Displacement (Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça)	É o valor máximo da oscilação sinusoidal aproximada da cabeça do espermatozoide acerca do trajeto. É medida como a distância máxima entre a posição efetiva do espermatozoide e a posição média correspondente do espermatozoide para todos os pontos no trajeto.
BCF	Beat Cross Frequency (Frequência de Cruzamento do Andamento)	A frequência em que a cabeça do espermatozoide cruza a linha do percurso médio durante a aquisição é a frequência de cruzamento do andamento.
LIN	Linearity (Linearidade)	A proporção VSL/VCL em porcentagem é uma medida da direção do trajeto e é denominada linearidade.
STR	Straightness (Retidão)	A proporção VSL/VAP em porcentagem é uma medida da compacidade do trajeto e é denominada retidão.
WOB	Wobble (Oscilação)	A proporção VAP/VCL em porcentagem é denominada oscilação.

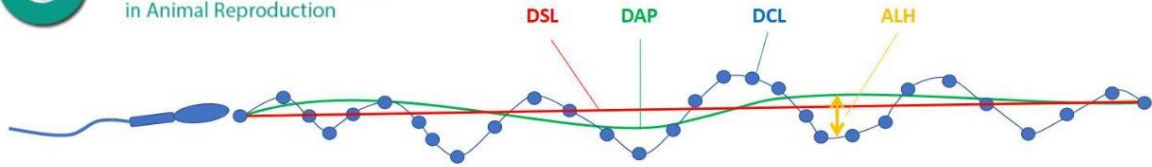
Fonte: (HAMILTON-THORNE, 2017)

ANEXO B - Parâmetros cinéticos e funções determinadas pelo CASA.

Parâmetro cinemático	Função do parâmetro
Progressive STR (STRP) (STR Progressiva)	Valor mínimo de Retidão (STR) em porcentagem necessário para um Trajeto ser contado como progressivo.
Progressive VAP (VAPP) (VAP Progressiva)	Valor mínimo de Velocidade do Percurso Médio necessário para um trajeto ser contado como progressivo.
Slow VAP (VAPS) (VAP Lenta)	Valor máximo de Velocidade do Percurso Médio em microns/s em que um Trajeto pode ser contado como lento.
Slow VSL (VSL) (VSL Lenta)	Valor máximo de Velocidade em Linha Reta em microns/s em que um Trajeto pode ser contado como lento.
Static Algorithm (Algoritmo Estático)	Determina qual algoritmo é usado para definir o Espermatozoide Estático. Selecione Length (Comprimento) para configuração padrão ou Width_Multiplier (Multiplicador_Largura) para configuração personalizada. Se Width_Multiplier for selecionado, o parâmetro Static Width Multiplier (Multiplicador de Largura Estática) (veja abaixo) é usado.
Static VAP (VAPSTATIC) (VAP Estática)	Valor máximo de VAP para um espermatozoide ser contado como estático.
Static VSL (VSLSTATIC) (VSL Estática)	Valor máximo de VSL para um espermatozoide ser contado como estático.
Static Width Multiplier (Multiplicador de Largura Estática)	Com base na largura da cabeça do espermatozoide, o movimento máximo que a cabeça de um espermatozoide pode fazer e ainda ser classificada como estática (p. ex., 0,50 é 50% da largura da cabeça do espermatozoide).

Fonte: (HAMILTON-THORNE, 2017)

ANEXO C – Parâmetros cinéticos de movimentação individual dos espermatozoides determinados pelo CASA.



DCL: Displacement on Curved Line
Deslocamento Curvilíneo (ou Total)

$$\rightarrow VCL = \frac{DCL}{t}$$

DAP: Displacement on Average Path
Deslocamento em Trajetória Média

$$\rightarrow VAP = \frac{DAP}{t}$$

$$\rightarrow WOB = \frac{VAP}{VCL}$$

WOBBLE (WOB): taxa entre deslocamento médio e deslocamento total é caracterizado como movimento oscilatório.

DSL: Displacement on Straight Line
Deslocamento em Linha Reta

$$\rightarrow VSL = \frac{DSL}{t}$$

$$\rightarrow STR = \frac{VSL}{VAP}$$

RETILINEARIDADE (STR): quão próxima de uma reta é a linha média de deslocamento.

$$\rightarrow LIN = \frac{VSL}{VCL}$$

LINEARIDADE (LIN): quão próxima de uma reta é a linha curvilínea de deslocamento.

ALH: Amplitude Lateral do Deslocamento da Cabeça

Valor máximo da oscilação sinusoidal da cabeça do espermatozóide ao longo da trajetória. É a distância máxima entre a posição real dos espermatozóides e a posição média correspondente para todos os pontos sobre a trajetória.

BCF: Frequência de Batida Cruzada

A frequência com que a cabeça do esperma atravessa a linha média do trajeto durante a aquisição é a frequência de batida cruzada.

Fonte: Cedida pelo autor Francisco, F. M. (2020).