

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE EM SISTEMA
COMPUTADORIZADO PARA CARACTERÍSTICAS DA MOTILIDADE DE SÊMEN
SUÍNO**

Guilherme Asmus Rodriguez

PORTO ALEGRE

2015/1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE EM SISTEMA
COMPUTADORIZADO PARA CARACTERÍSTICAS DA MOTILIDADE DE SÊMEN
SUÍNO**

Autor: Guilherme Asmus Rodriguez

**Trabalho apresentado como requisito
parcial para a obtenção da graduação em
Medicina Veterinária**

**Orientador: Dr. Fernando Pandolfo
Bortolozzo**

**Coorientador: Dra. Ana Paula Gonçalves
Mellagi**

PORTO ALEGRE

2015/1

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Léa Fernanda e à minha irmã Luiza por tanto amor e tanta paciência!

A *mi abuela* Sonia, aos meus avós Milton e Maria Léa, ao Adenor, ao Juan Carlos e a todos que, de alguma forma, me fazem entender claramente a importância da família no enfrentamento dos desafios do dia-a-dia.

A todos os meus amigos, principalmente ao Alex e à Carolina, pelo companheirismo, pelas risadas e pelo apoio ao longo dos anos, em especial, durante a fase de realização do TCC.

Aos colegas, aos funcionários e aos professores da Faculdade de Veterinária e do Setor e Suínos da UFRGS, especialmente aos professores Fernando Bortolozzo e Mari Lourdes Bernardi, à Ana Paula Mellagi e à Mariana Menegat, os quais foram de fundamental importância para a concretização deste trabalho e meu consequente crescimento acadêmico e pessoal.

RESUMO

Foi realizado um experimento com o objetivo de comparar o uso de lâminas e de lamínulas *versus* câmaras de contagem para a análise de motilidade de sêmen suíno, com o sistema computadorizado CASA, pela possibilidade de diminuição de custo de material. Foram utilizadas 18 doses inseminantes em que análise dos parâmetros de motilidade foi realizada após 24 h de armazenamento em conservadora de sêmen a 17-19°C. Foram comparados três métodos de análise: câmara - padrão-ouro, avaliação de cinco campos microscópicos; Lamínula 1 - avaliação de cinco campos entre lâmina e lamínula; Lamínula 2 - avaliação de cinco campos entre lâmina e lamínula, divididos em duas análises, cada uma com três e dois campos, respectivamente. Apesar da correlação entre o uso de lamínulas e câmara ter sido positiva e significativa, os índices de concordância não foram altos, indicando a necessidade de mais pesquisas para melhorar o método lâmina e lamínula de modo que ele possa substituir com segurança a câmara de contagem, no sistema CASA.

Palavras-chave: câmara de contagem; inseminação artificial; sistema CASA.

ABSTRACT

In order to reduce the material cost for computer-assisted semen analysis (CASA), a study was performed to compare the use of slide and coverslip versus counting chamber for motility analysis of boar semen. Eighteen inseminating doses from different boars were used to evaluate kinetic parameters after 24 h storage at 17-19°C. Three methods were compared: Counting Chamber - gold standard, evaluation of five microscopic fields; Coverslip 1 - evaluation of five fields between slide and coverslip; Coverslip 2- evaluation of five fields between slide and coverslip, divided into two analyses, each one with three and two fields, respectively. Despite the positive and significant correlations between coverslips and chamber, the concordance indexes were not high, indicating that more studies are required to improve the coverslip method so that it can reliably replace the counting chamber in CASA system.

Keywords: *artificial insemination; CASA system; counting chamber.*

LISTA DE ABREVIATURAS

ALH = Amplitude de deslocamento lateral da cabeça em relação ao traçado médio

AOC = Desvio médio de orientação

BCF = Frequência com que o traçado real cruza o traçado médio

CASA = *Computer-Assisted Sperm Analysis*

CCC = Coeficiente de correlação de concordância

CIA = Central de inseminação artificial

CORR = Coeficiente de correlação

DAP = Distância percorrida do traçado médio

DCL = Distância percorrida real

DI = Dose inseminante

DP = Desvio padrão

DSL = Distância percorrida em linha reta

IA = Inseminação artificial

IAT = Inseminação artificial tradicional

IAU = Inseminação artificial intrauterina

LIN = Linearidade (VSL/VCL)

STR = Retilinearidade (VSL/VAP)

VAP = Velocidade do trajeto médio

VCL = Velocidade em linha curvilínea

VSL = Velocidade em linha reta

WOB = Coeficiente de oscilação (VAP/VCL)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Parâmetros de avaliação de motilidade espermática.....	19
Figura 2 Exemplo amplamente conhecido de câmara de contagem no sistema CASA, Leja [®] é uma câmara descartável que varia em profundidade de 10 a 100 µm, e possui 2, 4 ou 8 poços de análise (preenchimento por capilaridade), dependendo da profundidade da câmara.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Requisitos mínimos importantes de qualidade do sêmen fresco suíno.....	14
Tabela 2 Parâmetros da cinética celular.....	18
Tabela 3 Correlação entre os métodos de análise para características de motilidade de sêmen suíno em sistema computadorizado Câmara e Lamínula 1 e 2.....	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E OBJETIVO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	Inseminação artificial	12
2.2	Avaliação espermática tradicional	13
2.2.1	Motilidade espermática: avaliação subjetiva.....	14
2.3	Avaliação espermática computadorizada	16
2.3.1	CASA (<i>Computer-Assisted Sperm Analysis</i>).....	16
2.3.2	Parâmetros de motilidade e tipos de movimento.....	17
2.4	Uso de câmaras de contagem	19
3	ARTIGO: COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE EM SISTEMA COMPUTADORIZADO PARA CARACTERÍSTICAS DA MOTILIDADE DE SÊMEN SUÍNO	21
3.1	Introdução	21
3.2	Material e métodos	21
3.3	Resultados e discussão	22
3.4	Conclusão	25
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
	REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVO

O Brasil é um dos líderes mundiais na produção e na exportação de suínos, abatendo 46 milhões de cabeças anualmente (ANUALPEC, 2014). Atualmente, a inseminação artificial (IA) apresenta-se essencial para a eficiência produtiva demandada na suinocultura industrial. Dessa forma, a análise de fatores relacionados à qualidade do sêmen – geralmente, motilidade, morfologia e concentração espermática - está entre os itens mais importantes para o aperfeiçoamento das tecnologias de reprodução assistida, e conseqüente sucesso econômico dos produtores.

Segundo Varner (2008), a motilidade espermática ainda é considerada uma das principais características a ser analisada em uma amostra de sêmen. Os valores de motilidade, avaliados em microscópio, são utilizados desde o século 17 e continuam sendo o principal critério de controle de qualidade para as centrais de processamento de sêmen (LENZ et al., 2011), sendo uma importante característica para a capacidade fertilizante do espermatozoide (FEITSMA, 2009).

A partir do desenvolvimento de um sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA - *Computer-Assisted Sperm Analysis*), na década de 80, parâmetros adicionais de motilidade, descrevendo os movimentos dos espermatozoides, tornaram a avaliação espermática mais objetiva e detalhada (KOMORI et al., 2006). Trata-se de um sistema automático de alta precisão de avaliação de imagem com um microscópio de contraste de fase, monitorada por computador (*software e hardware*), o qual tem como objetivo aumentar a precisão da análise de motilidade, por identificar as células individualmente.

Para essa tecnologia, usualmente utilizam-se câmaras de contagem (descartáveis ou reutilizáveis) especialmente projetadas e qualificadas, que variam em profundidade e em quantidade de poços de análise, e proporcionam precisão de valores dos parâmetros obtidos. Entretanto, o uso de câmaras de contagem eleva o custo da análise quando comparado à avaliação subjetiva. Comparativamente, a média de preços atuais da avaliação de uma amostra entre lâminas e lamínulas é de R\$ 14,60 (para cada 100 análises, utilizando em média duas lamínulas por análise), e da avaliação em câmaras de contagem é cerca de R\$ 490 (para cada 100 análises), gerando uma diferença de custo de aproximadamente 33 vezes.

O objetivo do presente trabalho é comparar o uso de lâminas e de lamínulas (utilizando dois métodos distintos) *versus* câmaras de contagem para a análise de motilidade de sêmen suíno, com o sistema computadorizado CASA, diante da possibilidade de

diminuição de custo de material rotina de controle da qualidade de doses inseminantes (DI) em centrais de inseminação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Inseminação artificial

Nas duas últimas décadas, a tecnologia de reprodução assistida tem crescido exponencialmente devido ao desenvolvimento de novas biotecnologias, tanto em humanos como em animais. A IA está incluída entre os métodos dessa tecnologia, e, embora não tão nova quanto outras, é ainda considerada uma das mais revolucionárias técnicas utilizadas em animais de produção (SORIANO-ÚBEDA et al., 2013). É realizada sem o contato direto da fêmea com o macho, através da coleta e da manipulação do sêmen, e da sua introdução e deposição no aparelho reprodutivo da fêmea, com instrumental e técnica apropriados, visando a fecundação (MIES FILHO, 1987). Em suínos, empregam-se as técnicas de inseminação artificial tradicional (IAT), que compreende a utilização de uma pipeta que mimetiza a extremidade do pênis suíno, permitindo a deposição do sêmen no canal cervical, e a inseminação artificial intrauterina (IAU), que consiste no emprego de um cateter introduzido pelo interior da pipeta tradicional, sendo os espermatozoides depositados diretamente no corpo do útero (BORTOLOZZO et al., 2008).

Embora tenha aplicação comercial relativamente recente na suinocultura, os primeiros experimentos com IA em suínos ocorreram na Rússia no início do século 20 (RODRÍGUEZ-GIL; ESTRADA, 2013). A produção moderna e tecnificada cada vez mais a utiliza como componente do manejo reprodutivo. A grande difusão da IA deveu-se, principalmente, ao surgimento de linhagens genéticas de machos terminais que agregaram às carcaças de seus descendentes as qualidades exigidas pela tipificação instituída na indústria de carnes (BORTOLOZZO et al., 2005b).

Dentre as inúmeras vantagens que levaram à sua ampla difusão, podem-se citar: ganhos genéticos com o emprego de machos geneticamente superiores, redução nos custos de cobertura, maior segurança sanitária, maiores cuidados higiênicos nas coberturas, eliminação dos ejaculados impróprios para uso e evolução técnica da equipe na implantação dessa tecnologia (FLOWERS; ESBENSHADE, 1993; WENTZ et al., 2000). Atualmente, mais de 90% dos suínos são inseminados artificialmente na União Europeia e nos Estados Unidos, chegando a 98% em alguns países (FEITSMA, 2009). No Brasil, apesar da falta de levantamentos estatísticos oficiais, o emprego da IA tem aumentado consideravelmente ano a ano, acompanhando o incremento dessa biotécnica ocorrido mundialmente (BORTOLOZZO et al., 2008).

A pesquisa em IA, nos últimos anos, tem buscado basicamente atingir dois objetivos: redução dos custos de cobertura e potencialização do emprego de machos geneticamente superiores (BORTOLOZZO et al., 2005b), tendo, portanto, a avaliação da motilidade espermática um papel fundamental. Os diferentes métodos para tanto, e suas ferramentas utilizadas nas avaliações, variam desde simples análises microscópicas subjetivas até sofisticados sistemas com alta objetividade e precisão. Esses sistemas foram desenvolvidos e implantados para atender à demanda da evolução da tecnologia de reprodução assistida

2.2 Avaliação espermática tradicional

Em Centrais de Inseminação Artificial (CIA), análises são realizadas rotineiramente com o intuito de avaliar a qualidade do sêmen suíno. Segundo Bortolozzo et al. (2005c), apesar da pouca correlação com a fertilidade obtida *in vivo*, é fundamental que o ejaculado seja submetido a um exame detalhado e acurado antes de ser liberado para a IA, sempre levando em consideração o valor e a limitação dos parâmetros obtidos *in vitro*, e a fertilidade do rebanho observada a campo.

Embora haja o desenvolvimento constante de tecnologias que facilitam e aumentam a precisão dos resultados observados nas avaliações espermáticas, na realidade atual da maioria das CIAs, no Brasil e no mundo, a avaliação dita tradicional, com utilização de materiais laboratoriais relativamente simples, é a mais utilizada. Trata-se de avaliações subjetivas, portanto, o fator humano na preparação é de grande importância (FEITSMA et al., 2011).

Para o processamento das DIs, cuja quantidade de espermatozoides varia de 1,5 bilhões até 4 bilhões, dependendo da técnica de IA a ser utilizada; o exame de todos os ejaculados assume um papel importante com vistas à eliminação de amostras inadequadas (BORTOLOZZO et al., 2005c). Portanto, após a coleta do sêmen, é realizada uma série de avaliações que são divididas, basicamente, em macroscópicas (volume, cor, odor e aspecto) e microscópicas (motilidade espermática, vigor, aglutinação, concentração espermática e morfologia espermática), além de outros exames complementares (coloração supravital, teste de resistência osmótica, exame bacteriológico e acompanhamento da motilidade espermática durante o armazenamento) (BENNEMANN, 2014).

Os parâmetros espermáticos variam de um indivíduo para outro devido a muitos agentes exógenos (alimentação, regime de utilização na reprodução, conforto, estresse, etc.) ou endógenos (genética, atividade neuroendócrina, etc.), influenciando a atividade espermatogênica dos testículos, e podendo modificar a qualidade do sêmen. Ademais, a

qualidade das DI inclui não só a origem (macho), mas também a viabilidade dos espermatozoides, o grau de aglutinação e a quantidade de defeitos morfológicos (MELLAGI, 2011). O estabelecimento de padrões de qualidade é, portanto, um processo complexo, com diferentes protocolos e constante evolução. Alguns requisitos mínimos importantes de qualidade do sêmen fresco suíno, padronizados para a rotina de CIAs segundo a Associação Central dos Suinocultores da Alemanha (ZDS, 2006), estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Requisitos mínimos importantes de qualidade do sêmen fresco suíno

Características	Requisitos mínimos
Cor	De branca-acinzentada a branca
Consistência	Leitosa
Misturas (urina, sangue e pus)	Ausência
Contaminações (fezes e pelo)	Ausência
Odor	Neutro
Volume sem a secreção da glândula bulbouretral	100 ml
Concentração espermática (10^9)	0,15/ml para machos \leq 9 meses 0,2/ml para machos $>$ 9 meses
Número total de espermatozoides no ejaculado (10^9)	15 para machos \leq 9 meses 20 para machos $>$ 9 meses
Motilidade espermática (%)	70
Total de espermatozoides com defeito morfológico (%)	\leq 25
Defeito de cabeça (%)	\leq 5
Defeito de acrossoma (%)	\leq 10
Gota citoplasmática (%)	\leq 15
Cauda enrolada (%)	\leq 15
Outros defeitos morfológicos (%)	\leq 15
Conteúdo Microbiano	Ausência de patógenos específicos para humanos ou animais

Fonte: adaptado de ZDS (2006)

2.2.1 Motilidade espermática: avaliação subjetiva

Avaliação subjetiva da motilidade espermática é o principal parâmetro utilizado para selecionar os ejaculados (BERNARDI, 2008). Trata-se de um exame simples, rápido, de baixo custo e bom indicador da integridade e funcionalidade das membranas (GADEA, 2005).

Realizado rotineiramente nas CIAs, apesar de subjetivo, é indispensável, indicando a viabilidade espermática (BORTOLOZZO et al., 2005c).

Sua determinação consiste em colocar uma gota de sêmen de 8 a 20 µl entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 35°C, e examinar ao microscópio óptico em aumento de 100 a 200 vezes. A análise deve ser realizada logo após a colocação da lamínula, em virtude da rápida redução da atividade espermática devido à baixa tensão de oxigênio existente entre lâmina e lamínula (BORTOLOZZO et al., 2005c). O julgamento conclusivo do percentual de motilidade é realizado após a avaliação de, no mínimo, três amostras de sêmen; considerando-se aquela que apresenta maior percentual de células móveis (CBRA, 2013). Caso seja necessário, há possibilidade de trabalhar com uma pré-diluição 1:1 (sêmen:diluyente) do ejaculado *in natura*, de forma a favorecer a análise (BENNEMANN, 2014).

A motilidade espermática total do ejaculado suíno tem uma média de 74-77%, com poucas diferenças entre raças (WOLF, 2009; WOLF & SMITAL, 2009). De acordo com isso, Smital et al. (2004) encontraram um coeficiente de variação para motilidade espermática inferior a 10% entre raças. É recomendável discriminar, a partir da avaliação microscópica, ejaculados bons (motilidade $\geq 60\%$) de ruins (motilidade $< 60\%$) (Broekhuijse et al., 2012). Pelo fato de a fertilidade ser comprometida, caso a motilidade esteja abaixo de 60% (FLOWERS, 1997), esse valor é usualmente utilizado como referência para a seleção das DIIs a serem usadas nas IA de suínos (BERNARDI, 2008). Entretanto, sob o ponto vista prático, adota-se o mínimo de 70%, como margem de segurança contra eventuais falhas individuais que possam acontecer no momento da estimativa dessa variável (BORTOLOZZO et al., 2005c), devendo ser um mínimo de 80% caso as doses sejam utilizadas 72h após a ejaculação (ALTHOUSE, 2007).

Segundo Broekhuijse et al. (2012), inúmeros estudos relataram variações de 30 a 60% nas avaliações de estimativas de motilidade espermática entre diferentes técnicos laboratoristas e entre estimativas de um mesmo técnico. Evidencia-se, assim, a limitação do ser humano em quantificar as diferentes subpopulações espermáticas nas amostras (VERSTEGEN et al., 2002) e a necessidade de padronização dessas avaliações (RIJSSELAERE et al., 2003; YEUNG et al., 1997). Ademais, em estudo de fatores que explicam variação na fertilidade suína, Broekhuijse et al. (2012) relataram, além da individualidade dos técnicos laboratoristas, também a realização das análises em diferentes CIAs, como fonte de variação de resultados, mostrando diferenças significativas entre porcentagem de motilidade espermática e sua consequente taxa de parição e total de leitões nascidos vivos.

Embora largamente utilizada em CIAs, como já relatado, a avaliação da motilidade espermática subjetiva não permite discriminação precisa de diferenças de motilidade entre amostras (BROEKHUIJSE et al., 2011). Dessa maneira, é importante compreender e considerar a utilização de métodos de avaliação computadorizada e avançada (com suas características, acessibilidade, vantagens, desvantagens e alternativas) dentro da cadeia da suinocultura.

2.3 Avaliação espermática computadorizada

A despeito da vasta utilização da avaliação espermática tradicional, os avanços da suinocultura moderna vão ao encontro de mudanças em todos os pontos da cadeia produtiva, sendo, uma delas, a modernização das técnicas de exame do ejaculado.

Alta precisão é essencial para atingir níveis de garantia de qualidade na produção de DIs, eficiência na sua produção e resultados de fertilidade a campo (BROEKHUIJSE et al., 2011). Dessa forma, segundo Soriano-Úbeda et al. (2013), desde a década de 40, cientistas já começaram a procurar uma maneira objetiva de analisar a motilidade dos espermatozoides nos ejaculados. No entanto, a relação entre os parâmetros modernamente mensurados e a capacidade fertilizante ainda não foram extensivamente analisados, e há poucos estudos comparativos sobre o valor das medidas obtidas no sistema computadorizado (BROEKHUIJSE et al., 2011).

Existem inúmeras técnicas propostas a aumentar a objetividade das avaliações espermáticas, principalmente em relação a da motilidade subjetiva, tais como a turbidimetria, a espectroscopia a laser-Doppler e os métodos fotométricos. No entanto, tais sistemas não consideram os parâmetros individuais dos espermatozoides, permitindo, apenas, uma estimativa grosseira de toda a população espermática (VERSTEGEN et al., 2002). Assim, devido à possibilidade de avaliação mais rápida e objetiva, fornecendo acesso a parâmetros espermáticos individuais, o sistema computadorizado CASA já é amplamente aceito pela comunidade da área de reprodução animal, tanto para a pesquisa em biologia espermática básica, quanto para o uso em unidades de produção (AMANN; WABERSKI, 2014), embora ainda não seja método de rotina em todas as CIAs (SANCHO; VILAGRAN, 2013).

2.3.1 CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*)

Em termos gerais, o sistema CASA consiste em câmera de vídeo de alta velocidade acoplada em microscópio de contraste de fase, que capturas as imagens da amostra e envia ao software. A maioria desses sistemas analisam a concentração espermática e a porcentagem de motilidade espermática e, alguns, as características morfológicas e morfométricas das células com um alto grau de repetibilidade (FEITSMA et al., 2011). Atualmente, existem mais de 12 sistemas CASA disponíveis no mercado, mundialmente, para uso com ejaculado animal (AMANN; WABERSKI, 2014).

Os sistemas, incluindo *software* e *hardware* (além de acessórios como microscópio, câmera e câmaras de contagem), independentemente do fabricante, possuem princípios similares e contam com constante atualização. Um exemplo, no que concerne à avaliação espermática suína, dentre outras espécies, é o Hamilton-Thorne Ceros[®] (HTR Ceros 12.1, Hamilton-Thorne Research, Beverly, CA, USA), que, assim como outras marcas, avalia o movimento individual dos espermatozoides por meio do processamento de imagens digitais das trajetórias da posição da cabeça dentro de um intervalo de tempo (VYT et al., 2008).

Além de comparações de métodos entre CASA e avaliações subjetivas, comparações de resultados entre diferentes sistemas computadorizados também são objeto de estudos. Tejerina et al. (2008) compararam o sistema CASA convencional SM-CMA[®] (SM-CMA, Medical Technologies, Montreaux, Switzerland) e o *software* QualiSperm[®] quanto à motilidade espermática suína, correlacionando resultados em diferentes concentrações e tempos de estocagem do sêmen.

Apesar das vantagens de objetividade e acesso a parâmetros espermáticos individuais, alguns estudos, como o de Feitsma et al. (2011), questionam a necessidade de seu uso pelas CIAs, ressaltando questões de controle de qualidade e de custo-benefício, bem como a falta de correlações mais consistentes entre parâmetros de motilidade e fertilidade a campo, e de padronização de variáveis analisadas entre os diferentes sistemas CASA.

2.3.2 Parâmetros de motilidade e tipos de movimento

Informações fornecidas pelo sistema CASA são especialmente interessantes no que se refere à qualidade do movimento dos espermatozoides (SANCHO; VILAGRAN, 2013). A maioria desses sistemas estabelece um centroide para cada espermatozoide (BOYERS et al., 1989), assim, o deslocamento dessas células (alterações na localização do centroide em sucessivos *frames*) são registrados e computados, fornecendo medidas que os descrevem (AMANN; WABERSKI, 2014). Utilizando imagens digitais da trajetória de cada célula, por

meio de algoritmos de processamento de imagem, as propriedades desses movimentos são analisadas (VERSTEGEN et al., 2002).

O movimento normal dos espermatozoides é retilíneo, em plano único, progressivo e com movimentos rápidos de cauda. Nos sistemas computadorizados, é possível identificar inúmeras mudanças sutis nas características da motilidade, como móvel não progressivo (movimento circular), linear lento, linear rápido e imóvel (VYT et al., 2004). Além de motilidade total, motilidade progressiva, rápida, lenta, circular e local, os parâmetros da cinética celular também podem ser analisados (Tabela 2).

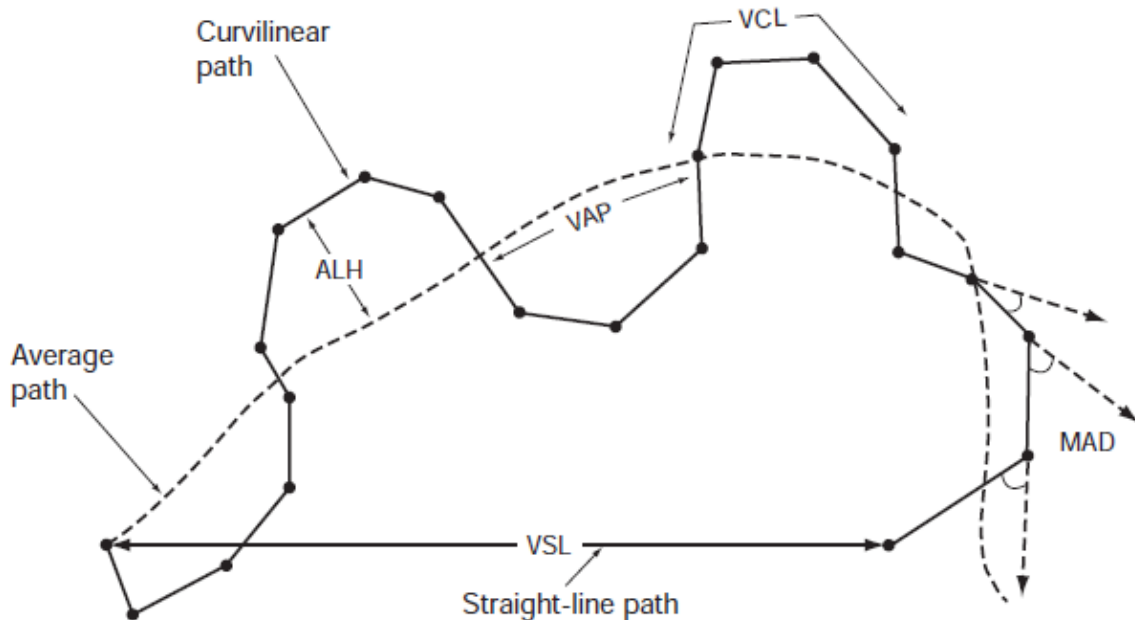
Tabela 2 - Parâmetros da cinética celular

Parâmetros	Descrição
DCL, μm	Distância percorrida real
DSL, μm	Distância percorrida em linha reta
DAP, μm	Distância percorrida do trajeto médio
VCL, $\mu\text{m/s}$	Velocidade em linha curvilínea
VSL, $\mu\text{m/s}$	Velocidade em linha reta
VAP, $\mu\text{m/s}$	Velocidade do trajeto médio
ALH, μm	Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
AOC, em $^{\circ}$	Desvio médio de orientação da cabeça no trajeto curvilíneo
BCF, Hz	Frequência com que a cabeça no trajeto curvilíneo cruza o trajeto médio
Retilinearidade, %	VSL/VAP
Linearidade, %	VSL/VCL
Wobble, %	VAP/VCL, oscilação do trajeto curvilíneo em relação ao trajeto médio

Um dos poucos recentes estudos que encontraram associação entre os parâmetros avaliados no sistema CASA e a fertilidade de machos suínos foi realizado por Broekhuijse et al. (2011), em que, em relação à taxa de parto, a porcentagem de motilidade progressiva demonstrou efeito positivo, e VCL e BCF, efeito negativo; e em relação ao número de leitões nascidos totais, a porcentagem de motilidade progressiva e VAP demonstraram efeito positivo, e VSL e ALH, efeito negativo. Didion (2008) relatou que, embora seja pouco conhecido se alguns desses parâmetros estão envolvidos com o processo de fecundação, retrospectivamente, essas características poderiam ser correlacionadas com a fertilidade individual de um reprodutor, e o entendimento da correlação de características específicas

teria o potencial de melhorar a eficiência da produção de sêmen suíno. Na figura 1 estão ilustrados alguns dos parâmetros de avaliação de motilidade fornecidos pelo sistema CASA.

Figura 1 - Parâmetros de avaliação de motilidade espermática



Average path = trajeto médio, *Curvilinear path* = trajeto curvilíneo, *Straight line path* = trajeto retilíneo

Fonte: WHO [2010]

2.4 Uso de câmaras de contagem

Os parâmetros utilizados para as análises no sistema CASA são modelados e refinados matematicamente para melhor descrever os parâmetros de movimento de cada espermatozoide, à medida que ele percorre através de um campo microscópico (BOYERS et al., 1989). Para tanto, ao microscópio, podem ser utilizados, basicamente, lâminas e lamínulas; câmaras de contagem descartáveis, como hemocitômetros e câmaras Leja[®] (Leja, Nieuw-Venep, Holanda) (Figura 2); ou reutilizáveis, como Makler[®] (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel), Cell-VU[®] (Millennium Sciences Inc., New York, USA) e ISAS[®] (ISAS, Proiser, Valencia, Spain).

Diante das inúmeras opções, estudos em diferentes espécies são realizados a fim de encontrar possíveis diferenças nos parâmetros espermáticos mensurados. Alguns exemplos são Hoogewijs et al. (2012), Lenz et al. (2011), Nöthling e Santos (2012) e Souza et. al. (2015), os quais compararam, respectivamente: valores de motilidade espermática equina

entre câmaras Leja[®] (2 e 4 poços) e ISAS[®] com diferentes profundidades, Makler[®] e lâmina e lamínula; motilidade espermática bovina entre câmaras Leja[®] 2 poços, Leja[®] 4 poços, Makler[®], e lâmina e lamínula; motilidade espermática bovina entre câmara Leja[®] 4 poços e diferentes combinações de campos microscópicos de lâmina e lamínula; motilidade espermática bovina entre câmaras Leja[®] 8 poços e Cell-VU[®].

Figura 2 – Exemplo amplamente conhecido de câmara de contagem no sistema CASA, Leja[®] é uma câmara descartável que varia em profundidade de 10 a 100 µm, e possui 2, 4 ou 8 poços de análise (preenchimento por capilaridade), dependendo da profundidade da câmara.



Fonte: Leja[®] [2015]

Apesar dos custos elevados, de acordo com Amann e Waberski (2014), as câmaras descartáveis são geralmente recomendadas para análise de motilidade, com profundidade de 10 ou 20 µm cuidadosamente controlada (profundidade certificada). No entanto, devido à viabilidade de redução de custos para as CIAs, são importantes as pesquisas que avaliem metodologias e estabeleçam, como alternativa, protocolos quanto ao uso de lâminas e lamínulas no sistema CASA, considerando, dentre outros fatores, os campos microscópicos.

3 ARTIGO: COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE EM SISTEMA COMPUTADORIZADO PARA CARACTERÍSTICAS DA MOTILIDADE DE SÊMEN SUÍNO

3.1 Introdução

A inseminação artificial (IA) é essencial para a eficiência produtiva demandada na suinocultura industrial. A análise de fatores relacionados à qualidade do sêmen – geralmente motilidade, morfologia e concentração espermática - está entre os itens mais importantes para o aperfeiçoamento das tecnologias de reprodução assistida. A avaliação da motilidade espermática é o principal parâmetro utilizado para selecionar os ejaculados (BERNARDI, 2008). Comercialmente, o objetivo principal de armazenamento do sêmen é manter os espermatozoides viáveis para um período de tempo variável, a fim de fertilizar uma alta proporção de oócitos com uma dose mínima de células e com um mínimo custo e risco sanitário (JOHNSON et al., 2000), sendo a rotina de análise de doses armazenadas uma importante ferramenta de controle de qualidade de doses produzidas pelas centrais de produção de sêmen.

A avaliação de doses retidas (contraprova) é uma importante ferramenta de controle de qualidade da Central de IA (CIA) e deve ser realizada ao longo de todo o armazenamento (BORTOLOZZO et al., 2008). O sistema computadorizado de análise espermática (CASA - *Computer-Assisted Sperm Analysis*) possibilita uma avaliação mais rápida e objetiva da motilidade, fornecendo acesso a parâmetros espermáticos individuais (AMANN; WABERSKI, 2014). No entanto, o custo do equipamento e dos materiais de consumo, principalmente câmara de contagem, é um fator determinante na tomada de decisão sobre sua utilização para análise de controle de qualidade.

Dessa forma, diante da possibilidade de redução de custo operacional, o objetivo do trabalho foi comparar o uso de câmara de contagem *versus* lâminas e lamínulas para a análise de motilidade de doses de sêmen suíno com o sistema CASA.

3.2 Material e métodos

Foram utilizadas doses inseminantes (DI) provenientes de 18 machos reprodutores suínos (AGPIC® 337) de uma central tecnificada de produção de sêmen suíno, localizada no município de Estrela, RS. Após a coleta do ejaculado, o sêmen foi analisado através do

sistema CASA (SpermVision®, Minitüb GmbH) e foram produzidas doses com 1,5 bilhão de espermatozoides em 45 ml de volume total em diluente BTS (Beltsville Thawing Solution, Minitüb GmbH). A análise dos parâmetros de motilidade espermática (total, progressiva, rápida, lenta, circular, local) e demais parâmetros de cinética espermática foi realizada após 24 h de armazenamento em uma conservadora de sêmen à temperatura média de $17,8^{\circ}\text{C} \pm 0,49$. Para a avaliação, 1 ml de cada dose foi incubada a 38°C durante 10 minutos.

Cada amostra foi avaliada no sistema CASA (AndroVision®, Minitüb GmbH) utilizando câmaras de contagem (Leja® - 20 µm profundidade) e lâminas e lamínulas (Precision®, 18x18 mm, 0,13-0,16 mm de espessura). A câmara foi preenchida por capilaridade com 3 µl de sêmen. Para a avaliação entre lâmina e lamínula, uma gota de 5 µl de sêmen foi disposta sobre a lâmina e coberta cuidadosamente com a lamínula, evitando-se a formação de bolhas. Ambas foram avaliadas ao microscópio óptico sob objetiva de 20x e contraste de fase negativo, imediatamente após o preenchimento.

Os campos microscópicos dos diferentes métodos foram analisados das seguintes maneiras: Câmara - padrão-ouro, cinco campos; Lamínula 1 - cinco campos distribuídos igualmente ao longo do raio equatorial da lamínula, da borda ao centro (adaptado de Nöthling e Santos, 2012); Lamínula 2 - cinco campos divididos em duas lâminas, cada uma com três e dois campos distribuídos igualmente ao longo do raio equatorial da lamínula da borda ao centro.

Para a análise estatística, foi determinado o coeficiente de correlação de Pearson, ao nível mínimo de significância de 5% ($P \leq 0,05$), além do coeficiente de correlação de concordância (CCC) para avaliar a concordância (LIN, 1989) de análise entre os dois métodos com uso de lamínulas e a câmara de contagem Leja®.

3.3 Resultados e discussão

De um modo geral, o método Lamínula 2 apresentou maior número de variáveis espermáticas com correlação significativa com o método Câmara do que o método Lamínula 1 (Tabela 3). No entanto, nenhum coeficiente de correlação ultrapassou o valor de 0,65 e, quando considerado o CCC entre os métodos Câmara e Lamínula 2, os valores para motilidade total, progressiva e circular e BCF foram 0,591, 0,512, 0,508 e 0,540, respectivamente, sendo considerados de concordância moderada, de acordo com Landis e Koch (1977).

Esses valores são considerados baixos em comparação ao estudo de Nöthling e Santos (2012), os quais avaliaram a motilidade espermática bovina em 12 campos distribuídos igualmente ao longo do raio equatorial da lamínula da borda ao centro e observaram CCCs altos, próximos a 0,9. Segundo Verstegen et al. (2002), a precisão dos resultados de análise aumenta não somente conforme aumenta o número de campos avaliados, mas também o número de células por campo, relatando também as quantidades de campos e de número de células recomendadas para avaliação espermática de diferentes espécies. No presente estudo, essa diferença poderia estar associada ao número de campos utilizados (cinco campos), o qual resultaria em médias imprecisas de motilidade pela análise de um número pequeno de subpopulações espermáticas. Entretanto, na rotina de processamento de sêmen suíno, a contagem de um número elevado de campos torna-se impraticável, pois o espermatozoide suíno tem alta suscetibilidade à baixa tensão de oxigênio existente entre lâmina e lamínula (BORTOLOZZO et al., 2005a), com redução da motilidade espermática poucos segundos após a colocação da lamínula.

É possível que as diferenças observadas entre a câmara de contagem e o método de lâmina e lamínula possam também estar relacionadas com a profundidade das mesmas e à aderência da superfície de vidro com as células (MASSÁNYI et al., 2008), além de estimativas incorretas devido ao viés de amostragem entre as subpopulações (DOHOO et al., 2010). Lenz et al. (2011), no entanto, encontraram porcentagens de motilidade total e progressiva espermática bovina superiores para lâmina e lamínula. De acordo com Hoogewijs et al. (2012), que obtiveram, também, valores de motilidade progressiva equina significativamente maiores para lâmina e lamínula comparadas a câmaras de contagem, pode, inclusive, haver superestimação de valores na utilização desse método. Assim, fica evidente a grande variação de técnicas e a falta de uniformidade na preparação de amostras, de modo a permitir a padronização de avaliação da motilidade, no sistema CASA, com métodos alternativos à câmara Leja[®].

Tabela 3 - Correlação entre os métodos de análise para características de motilidade de sêmen suíno em sistema computadorizado Câmara e Lamínula 1 e 2

Variáveis	Câmara	Lamínula 1			Lamínula 2		
	Média±DP	Média±DP	CORR	CCC	Média±DP	CORR	CCC
Motilidade total, %	80,6±8,5	78,3±12,2	0,227	0,208	82,1±12,1	0,636***	0,591
Motilidade progressiva,%	73,0±10,0	66,5±15,3	0,140	0,113	72,5±14,5	0,549***	0,512
Motilidade rápida,%	56,2±11,4	31,0±13,1	-0,132	-0,042	35,3±13,1	0,124	0,050
Motilidade lenta, %	15,7±5,8	34,1±9,4	0,289	0,068	35,4±11,1	0,102	0,024
Motilidade circular, %	1,1±1,3	1,4±1,6	0,430**	0,414	1,7±1,4	0,566***	0,508
Motilidade local, %	7,6±2,4	11,9±6,0	-0,116	-0,055	9,6±4,9	0,054	0,037
ALH, µm	1,2±0,15	0,80±0,16	0,034	0,008	0,82±0,14	0,540***	0,121
BCF, Hz	15,2±3,2	13,8±3,2	0,193	0,177	15,3±3,6	0,543***	0,540
DAP, µm	16,5±3,1	11,5±3,0	0,091	0,038	12,5±3,2	0,511**	0,279
DCL, µm	38,6±6,0	28,6±6,1	-0,044	-0,019	30,0±5,8	0,412*	0,201
DSL, µm	11,5±2,5	8,6±2,5	0,106	0,062	9,5±2,7	0,422*	0,324
LIN, %	0,31±0,03	0,29±0,06	0,515**	0,399	0,31±0,06	0,490**	0,413
VAP, µm/s	46,6±9,1	31,0±8,9	0,109	0,044	34,1±9,4	0,543***	0,284
VCL, µm/s	106,6±18,2	74,7±18,6	0,011	0,044	79,4±17,4	0,471**	0,217
VSL, µm/s	34,3±7,6	24,1±7,4	0,107	0,056	27,0±8,0	0,479**	0,334
WOB, %	0,43±0,03	0,38±0,06	0,518**	0,275	0,40±0,06	0,552***	0,353

*P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.

Lamínula 1: cinco campos distribuídos igualmente ao longo do raio equatorial da lamínula, da borda ao centro; Lamínula 2: cinco campos divididos em duas lâminas, uma com três e outra com dois campos; DP: desvio padrão; CORR: coeficiente de correlação; CCC: coeficiente de concordância da correlação; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça em relação ao traçado médio; BCF: frequência com que o traçado real cruza o traçado médio; DAP: distância percorrida do traçado médio; DSL: distância percorrida em linha reta; DCL: distância percorrida real; VAP: velocidade do trajeto médio; VCL: velocidade em linha curvilínea; VSL: velocidade em linha reta; LIN (linearidade): VSL/VCL; WOB (Wobble): VAP/VCL.

Apesar das dificuldades encontradas nas análises dos grupos Lamínula 1 e Lamínula 2 (falta de padronização da distribuição da gota e eventual formação de bolhas), gerando necessidade de repetição de procedimentos, é importante ressaltar a maior viabilidade de repetir a análise em menor número de campos a cada vez. Na rotina de análise de DIs armazenadas, cada partida deve ter uma dose retida para avaliação durante o período de armazenamento ou, até mesmo, além do período utilizado pelas granjas. Entretanto, com grande número de DIs a serem analisadas, o uso de câmaras de contagem torna-se inviável devido ao custo, aproximadamente 33 vezes maior, comparado ao de lâmina e lamínula. Assim, é importante continuar investigando maneiras de aperfeiçoar o método lâmina e lamínula, no intuito de viabilizar o uso da análise computadorizada para o controle da qualidade de DIs.

3.4 Conclusão

Apesar de haver concordância entre os métodos, os valores estão abaixo do necessário para garantir que o método de câmara possa ser substituído pelo método com lâmina e lamínula, sobretudo em situações em que a precisão da informação é essencial. Por outro lado, é possível que o aperfeiçoamento do método lâmina e lamínula resulte em grau de precisão suficiente para a análise de variáveis como motilidade total e progressiva, na rotina de controle da qualidade de DIs em centrais de inseminação.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da constante expansão do uso de tecnologias avançadas pelas CIAS, e dos resultados obtidos no presente experimento, foi possível demonstrar a possibilidade concreta de busca de alternativas de substituição aos consumíveis de alto custo. No entanto, para alcançar precisão de resultados, é importante ressaltar que a utilização de câmaras de contagem no sistema CASA continua sendo imprescindível, principalmente para a realização de análises de sêmen *in natura*. Além disso, embora os principais parâmetros de motilidade espermática (avaliados nas DIs armazenadas na rotina das CIAs) tenham apresentado correlações satisfatórias entre os métodos padrão-ouro e alternativo, ainda há falta de estudos que resultem em padronização de protocolos laboratoriais para o uso de lâminas e lamínulas para sêmen da espécie suína, a exemplo do que ocorre na avaliação espermática humana.

REFERÊNCIAS

- ALTHOUSE, G. C. Artificial insemination in swine: boar stud management. *In: YOUNGQUIST, R.; THRELFALL, W. (Ed.) Current therapy in large animal theriogenology*. 2 ed. St. Louis, MO: Saunders Elsevier, 2007. p. 731-738.
- AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*, v. 81, n.1, p. 5-17, 2014.
- ANUALPEC. **Anuário da pecuária brasileira**, 2014, FNP. Disponível em: <www.anualpec.com.br>. Acesso em: 20 abr 2015.
- AWDA, B. J.; MACKENZIE-BELL, M.; BUHR, M. M. Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biology of reproduction*, v. 81, p. 553-561, 2009.
- BENNEMANN, P. E. Técnicas de avaliação, contagem, processamento, diluição e envase do sêmen suíno. *In: Produção de suínos: teoria e prática*. 1 ed. Brasília: ABCS, 2014. p. 334-348.
- BERNARDI, M. L. Tecnologias aplicadas no exame do ejaculado suíno para a produção de doses de sêmen de alta qualidade. *Acta scientiae veterinariae*, v. 36, p. 5-16, 2008.
- BORTOLOZZO, F. P.; BERNARDI, M. L.; BENNEMANN, P. E.; WENTZ, I. Inseminação artificial em suínos. *In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Ed.). Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*, São Paulo: Roca, 2008. p. 125-144.
- BORTOLOZZO, F. P.; BENNEMANN, P. E.; BERNARDI, M. L.; WENTZ, I. Coleta do ejaculado. *In: BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. (Ed.). Suinocultura em Ação - Inseminação artificial na suinocultura tecnificada*. Porto Alegre: Palotti, 2005a, v.2, p.57-67.
- BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. *Acta scientiae veterinariae*, v. 33, n. 1, p. 17-32, 2005b.
- BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; FERREIRA, F. M.; BENNEMANN, P. E.; BERNARDI, M. L. Exame do ejaculado. *In: BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. (Ed.). Suinocultura em Ação - inseminação artificial na suinocultura tecnificada*. Porto Alegre: Palotti, 2005c, v. 2 p. 69-90.
- BOYERS, S. P.; DAVIS, R. O.; KATZ, D. F. Automated semen analysis. *Current problems in obstetrics gynecology and fertility*, v. 12, p.167-200, 1989.
- BROEKHUIJSE, M. L. W. J.; SOSTARIC, E.; FEITSMA, H; GADELLA, B. M. The value of microscopic semen motility assessment at collection for a commercial artificial insemination centre, a retrospective study on factors explaining variation in pig fertility. *Theriogenology*, v. 77, p. 1466-1479, 2012.

BROEKHUIJSE, M. L. W. J.; SOSTARIC, E.; FEITSMA, H; GADELLA, B. M. Application of computer assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. **Journal of animal science**, v. 90, n. 3, p. 779-789, 2011.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3 ed. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 3 ed. Belo Horizonte: Patterson. 2013, p. 48.

DIDION, B. A. Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples. **Theriogenology**, v. 70, p. 1374-1376, 2008.

DOHOO, I.; WAYNE, M.; STRYHN, H. **Veterinary epidemiologic research**. 2 ed. VER Inc., Prince Edward Island: Canada, 2010.

FEITSMA, H. Artificial insemination in pigs, research and developments in the Netherlands, a review. **Acta scientiae veterinariae**, v. 37, n. 1, p. 61-71, 2009.

FEITSMA, H.; BROEKHUIJSE, M. L.W. J.; GADELLA, B. M. Do CASA systems satisfy consumers demands? A critical analysis. **Reproduction in domestic animals**, v. 46, n. 2, p. 49-51, 2011.

FLOWERS, W. L. Management of boars for efficient semen production. **Journal of reproduction and fertility**, v. 52, p. 67-78, 1997.

FLOWERS, W. L.; ESBENSHADE, K. L. Optimizing management of natural and artificial mating in swine. **Journal of reproduction and fertility**, v. 48, p. 217-228, 1993.

GADEA, J. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 431-444, 2005.

HOOGEWIJS, M. K.; DE VliegHER, S. P.; GOVAERE, J. L.; DE SCHAUWER, C.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Influence of counting chamber type on CASA outcomes of equine semen analysis. **Equine veterinary journal**, v. 44, p. 542-549, 2012.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 143-172, 2000.

KOMORI, K.; TSUJIMURA, A.; ISHIJIMA, S.; TANJAPATKUL, P.; FUJITA, K.; MATSUOKA, Y.; TAKAO, T.; MIYAGAWA, Y.; TAKADA, S.; OKUYAMA, A. Comparative study of sperm motility analysis system and conventional microscope semen analysis. **Reproductive medicine and biology**, v. 5, p. 195-200, 2006.

LANDIS J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33(1), p. 159-174, 1977.

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

LIN, L. I. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. **Biometrics**, v. 45(1), p. 255-268, 1989.

MASSÁNYI, P.; CHRENEK, P.; LUKÁČ N.; MAKAREVICH, A.V.; OSTRO, A.; ŽIVČAK, J.; BULLA, J. Comparison of different evaluation chambers for analysis of rabbit spermatozoa motility parameters using CASA system. **Slovak journal of animal science**, v. 41, n. 2, p. 60-66, 2008.

MELLAGI, A. P. G. Fatores de risco para contaminação: como otimizar a higiene na coleta e processamento do ejaculado. *In: Anais do II Simpósio de Reprodução Minitub*, Porto Alegre, 2011. p. 6-16.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais/inseminação artificial**. 6 ed, 2 v, Porto Alegre: Sulina, 1987, 750p.

NÖTHLING, J.O.; SANTOS, I.P. Which fields under a coverslip should one assess to estimate sperm motility? **Theriogenology**, v. 77, p. 1686-1697, 2012.

PINART, E.; PUIGMULÉ, M. Factors affecting boar reproduction, testis function, and sperm quality. *In: BONET, S.; CASAS, I.; HOLT, W.; YESTE, M. (Ed.). Boar reproduction: fundamentals and new biotechnological trends*. Berlin: Springer, 2013. p. 109-202.

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

RODRÍGUEZ-GIL J. E.; ESTRADA, E. Artificial insemination in boar reproduction. *In: BONET, S.; CASAS, I.; HOLT, W.; YESTE, M. (Ed.). Boar reproduction: fundamentals and new biotechnological trends*. Berlin: Springer, 2013. p. 589-607.

SANCHO, S.; VILAGRAN, I. The boar ejaculate: sperm function and seminal plasma analyses. *In: BONET, S.; CASAS, I.; HOLT, W.; YESTE, M. (Ed.). Boar reproduction: fundamentals and new biotechnological trends*. Berlin: Springer, 2013. p. 471-516.

SMITAL, J.; DE SOUSA, L. L.; MOHSEN, A. Differences among breeds and manifestation of heterosis in AI boar sperm output. **Animal reproduction science**, v. 80, p. 121-130, 2004.

SORIANO-ÚBEDA, C.; MATÁS, C.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A. An overview of swine artificial insemination: retrospective, current and prospective aspects. **Journal of experimental and applied animal science**, v. 1, n. 1, p. 67-97, 2013.

SOUZA, A. K.; MELANDA, C. A. A.; PARANZINI, C. S.; TRAUTWEIN, L. G. C.; PEREIRA, F. R.; MARTINS, M. I. M. Comparação da avaliação computadorizada da cinética espermática bovina pós descongelamento utilizando as câmaras CELL-VU[®] e Leja[®]. *In: Anais do Congresso brasileiro de reprodução animal*, Belo Horizonte: CBRA, 2015. p. 71.

TEJERINA, F.; BURANAAMNUAY, K.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments. **Theriogenology**, v. 69, p. 1129-1138, 2008.

VARNER, D. D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v. 70, p. 448-462, 2008.

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

VYT, P.; MAES, D.; RIJSSELAERE, T.; DEJONCKHEERE, E.; CASTRYCK, F. Motility assessment of porcine spermatozoa: a comparison of methods. **Reproduction in domestic animals**, v. 39, p. 447-453, 2004.

WENTZ, I.; VARGAS, A. J.; BORTOLOZZO, F. P.; CASTAGNA, C. D. Situação atual da inseminação artificial em suínos no Brasil e viabilização econômica do emprego dessa biotécnica. *In: Anais do III Simpósio internacional de inseminação artificial em suínos*, Flores da Cunha, 2000. p. 5-12.

WOLF, J. Genetic parameters for semen traits in AI boars estimated from data on individual ejaculates. **Reproduction in domestic animals**, v. 44, p. 338-344, 2009.

WOLF, J.; SMITAL, J. Quantification of factors affecting semen traits in artificial insemination boars from animal model analyses. **Journal of animal science**, v. 87, p. 1620-1627, 2009.

YEUNG, C. H.; COOPER, T. G.; NIESCHLAG, E. A technique for standardization and quality control of subjective sperm motility assessments in semen analysis. **Fertility and sterility**, v. 67, p. 1156-1158, 1997.

ZDS. Associação Central dos Suinocultores da Alemanha. Discovering the secrets of good sperm quality. **International pig topics**, v. 24, n. 8, 2006.