

Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura

Computer-assisted sperm analysis (CASA): a review

D.L. Matos¹, A.A. Araújo, I.G. Roberto, R. Toniolli

Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – FAVET/UECE
Universidade Estadual do Ceará, Campus do Itaperi, CEP: 60700-000, Fortaleza-CE

¹Correspondência: dadamatos@hotmail.com.br

Resumo

A avaliação da motilidade e morfologia são essenciais na análise da qualidade do sêmen. A análise desses parâmetros tem sido baseada na avaliação subjetiva, resultando em variações de até 60%. Para reduzir a subjetividade, sistemas automáticos de análise seminal (CASA) vêm sendo desenvolvidos, fornecendo confiabilidade e velocidade de obtenção dos dados, mas seu uso é limitado devido à necessidade de validação dos dados, controle de qualidade e padronização das análises. A uniformização desse instrumento permitirá a comparação de resultados e fornecerá subsídios para melhorar as biotecnias da reprodução. Diante de sua importância, faremos uma breve revisão das informações disponíveis sobre esta tecnologia, abordando o funcionamento, as vantagens e aplicações do CASA.

Palavras-chave: análise computadorizada de sêmen, motilidade espermática, morfologia espermática.

Abstract

The assessment of sperm motility and morphology are essential for examination of sperm quality. The analysis of these parameters has been based on subjective evaluation, resulting in variations of up to 60%. To reduce the subjectivity, computer-assisted sperm analysis (CASA) have been developed providing reliability and speed for semen analysis, but its use is limited due the need of validation of data, quality control and standardization. The uniformity of this instrument will allow comparison of results and provide allowance to improve the biotechnologies of reproduction. In view of its importance, we will make a brief review about this methodology, approaching the function of the CASA, benefits of its use and applications.

Keywords: *Computer-assisted sperm analysis (CASA), sperm motility, sperm morphology.*

Introdução

O CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) é um sistema automático (hardware e software) utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula bem como de subpopulações de células espermáticas (Amann e Katz, 2004).

A análise da motilidade e morfologia espermática têm sido apontadas por muitos autores como importante ferramenta na seleção de um ejaculado, sendo a determinação da porcentagem de espermatozoides móveis, o teste mais utilizado para prever a qualidade seminal (Verstegen *et al.*, 2002).

Tradicionalmente, a quantificação da qualidade espermática tem sido baseada na avaliação subjetiva, usando estimativa visual de parâmetros como motilidade massal e individual, contudo, estudos relatam existir uma variação de 30 a 60% na estimativa desses parâmetros devido à limitação do ser humano em quantificar as diferentes subpopulações espermáticas na amostra (Amann e Hammerstedt, 1980; Verstegen *et al.*, 2002).

Para reduzir a subjetividade, nos últimos 15 anos, sistemas automáticos para análise computadorizada de sêmen (CASA) vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de fornecer dados acurados da motilidade de cada espermatozoide e resumo estatístico das subpopulações (Verstegen *et al.*, 2002). Este equipamento pode ainda ser utilizado para mensurar o número de células por unidade de volume e ser modificado para capturar dados aproximados para classificação morfométrica de cada célula examinada (Amann e Katz, 2004).

Os diferentes instrumentos CASA têm demonstrado altos níveis de precisão e confiança usando diferentes metodologias de classificação que fornecem uma grande ferramenta para melhorar nosso conhecimento e habilidade para analisar espermatozoides (Verstegen *et al.*, 2002), tornando-se essencial à pesquisa, ao treinamento de pessoal e à padronização entre laboratórios (Amann e Hammerstedt, 1980).

Diante de sua importância, faremos aqui, uma breve revisão do estado atual do conhecimento da tecnologia CASA, abordando seu funcionamento, aplicações, vantagens, limitações e impactos na biologia espermática e clínica.

Evolução da metodologia de análise espermática computadorizada

No início da década de 40, estudiosos tiveram a necessidade de obter dados objetivos na porcentagem de espermatozoides móveis e informações sobre a velocidade do movimento dessas células. Acreditavam que, se fossem obtidos dados precisos do movimento espermático, seria possível prever o potencial de fertilidade de um macho ou selecionar o melhor procedimento para preparação do espermatozoide (Amann e Katz, 2004).

Entre os vários métodos de avaliação idealizados, Lord Rothschild, ainda na década de 40, introduziu o uso de fotografias em tempo real, usando iluminação de campo escuro para criar imagens da trajetória do movimento do espermatozoide e, manualmente, determinar a velocidade de deslocamento (Verstegen *et al.*, 2002; Amann e Katz, 2004).

Esse sistema e outros desenvolvidos na mesma época eram incapazes de mensurar a velocidade individual das células, o que só foi possível a partir de 1978, quando surgiu o primeiro sistema automático capaz de avaliar a trajetória do movimento espermático baseado na avaliação individual (Verstegen *et al.*, 2002; Amann e Katz, 2004).

Vale ressaltar que o pioneiro Expert Vision® desenvolvido pela Motion Analysis Corporation, Santa Rosa, Califórnia, mais tarde chamado Cell Track®, não era um sistema específico para esse tipo de análise (Amann e Katz, 2004).

O primeiro sistema CASA para comercialização desenvolvido especificamente para avaliação da motilidade espermática foi o CellSoft® (CRYO Resources, Montgomery, New York) comercializado por volta de 1985 para uso em laboratório de pesquisa e laboratórios médicos (Mack *et al.*, 1988). Em 1986, surgiu o HTM 2000® Hamilton-Thorn Research, Beverly, Massachusetts, também desenvolvido especificamente para esse tipo de análise (Amann e Katz, 2004).

Em 1992, surgiu o HTM-IVOS Sperm Analyzer®, um sistema integrado de computador e microscópio que permitia a aquisição de imagens digitalizadas, fornecendo classificação automática dos movimentos espermáticos, informando porcentagem de móveis, média de velocidade e porcentagem de progressivos (Iguer-Ouada e Verstegen, 2001).

Atualmente, a HTM disponibiliza versões como HTM-IVOS 10® e HTM-CEROS 12.1®. A versão HTM-IVOS 10® é proposta para avaliação do sêmen humano, mas já foi validado para outras espécies como a canina. A versão HTM-CEROS 12.1® permite ainda avaliar morfologia e morfometria espermática (Iguer-Ouada e Verstegen, 2001). Atualmente em adição ao HTM, existe outro sistema comercial de CASA, o SM-CMA® (Stromberg-Muka Band Feilnback, Germany; Davis e Katz, 1993), entre outros disponíveis no mercado.

Independente do fabricante, os diferentes instrumentos são baseados em princípios similares, mas diferem em termos de óptica usada e de *software* para a identificação do espermatozoide e a construção da trajetória, respectivamente (Kraemer *et al.*, 1998).

Nos últimos anos, relatos utilizando esse sistema têm aumentado significativamente, e a principal espécie no qual tem sido utilizado é a humana. Os centros de avaliação da fertilidade em humanos tem usado este equipamento para avaliação da qualidade espermática para posterior uso em técnicas da reprodução e para estudar a existência ou não de correlação da qualidade espermática (morfologia e motilidade) com a fertilidade (Verstegen *et al.*, 2002).

Em medicina veterinária, o CASA ainda não é uma prática rotineira. Embora já seja verificada sua validação em várias espécies como bovina, suína, esse sistema ainda não está inteiramente padronizado para todas as espécies de animais (Verstegen *et al.*, 2002).

Vantagens e desvantagens da técnica

O sistema é adequado para quantificar um grande número de células com padrão de motilidade heterogêneo em um curto período de tempo (Mack *et al.*, 1988; Farrel *et al.*, 1996), fornecendo dados de concentração de espermatozoides/mL, morfologia, motilidade e velocidade, detectando mudanças sutis nos parâmetros sob várias condições experimentais (Kraemer *et al.*, 1998).

Além da execução do exame, o sistema permite a catalogação de pacientes num banco de dados, assim como, o armazenamento de informações relevantes, criando um ambiente de trabalho caracterizado pela confiabilidade, versatilidade, facilidade de manuseio e de configuração. As avaliações são rapidamente executadas, e os resultados são facilmente catalogados, permitindo que seja atingido alto nível de automação em laboratórios, clínicas, empresas e universidades.

Embora o sistema tenha muitas vantagens, ele apresenta algumas desvantagens que tornam seu uso limitado (Verstegen *et al.*, 2002): o elevado custo do equipamento e a necessidade de validação, o controle de qualidade e a padronização das avaliações realizadas (Davis e Katz, 1993).

Aplicações do sistema CASA

Resultados significativos têm sido obtidos em pesquisas básicas, o que não teria sido possível sem a tecnologia CASA. O sistema tem demonstrado ser uma ferramenta útil no monitoramento da qualidade espermática de amostras submetidas a diferentes tratamentos experimentais (Farrel *et al.*, 1996), na pesquisa de novos diluidores seminais, crioprotetores ou outros tipos de processamento (Amann e Katz, 2004).

É também valioso na quantificação da hiperativação, no estabelecimento da relação entre qualidade do sêmen do doador e a verdadeira fertilidade da amostra e nas avaliações gerais da conveniência do uso de machos para reprodução (Farrel *et al.*, 1996; Versteegen *et al.*, 2002).

Funcionamento do CASA

No método de análise espermática computadorizada, a avaliação de motilidade em seus diversos parâmetros é realizada rigorosamente por um sistema estroboscópico de alta precisão totalmente controlado por computador. Utiliza-se videomicrografia que faz o monitoramento constante e análise seqüencial do movimento do espermatozóide (Mortimer, 2000; Amann e Katz, 2004).

Embora seja o flagelo a parte do espermatozóide que origina a motilidade, os sistemas automáticos avaliam o movimento da cabeça, porque é tecnicamente mais fácil acompanhar esse movimento do que o do flagelo (Amann e Katz, 2004).

Isso porque a freqüência do batimento flagelar é muito alta (acima de 80 batimentos por segundo para espermatozóide humano lavado), sendo então necessário, pelo menos, 200 observações por segundo para mensurar o padrão do batimento flagelar corretamente. Atualmente, os sistemas de vídeo analisam 25-60 imagens/s, ou seja, usam uma menor freqüência que a necessária para avaliação do batimento flagelar, impossibilitando a aquisição de boas imagens. Já a cabeça não se move tão rapidamente como a cauda, o que possibilita a obtenção de imagens relativamente claras, utilizando a tecnologia de vídeo convencional (Mortimer, 2000).

Por meio do uso de microscópio com contraste de fase, as células espermáticas são mais claramente visualizadas no meio onde elas se encontram, o que permite a detecção e o rastreamento dessas células. O processo de detecção automática das células, denominado segmentação, é então realizado pelo sistema comparando a intensidade da imagem adquirida com um limiar de intensidade pré-estabelecido (Mortimer, 2000).

O tamanho mínimo e máximo aceitável para a cabeça do espermatozóide de cada espécie é padronizado pelo sistema, e o computador irá reconhecer um objeto que cair dentro da faixa de tamanho de cabeça espermática pré-estabelecida. Partículas presentes na imagem com tamanho abaixo deste limiar serão considerados parte do fundo (Mortimer, 2000).

Análise das imagens e obtenção dos parâmetros de motilidade

Para a análise da motilidade propriamente dita, primeiro cada imagem captada pela câmera acoplada ao microscópio é convertida em imagem digital, e a organização seqüencial de diversas imagens digitais dão origem a um filme. Cada conjunto de imagens captadas em diversos campos de observação da amostra espermática em avaliação são automaticamente analisadas (Donald *et al.*, 1988).

O *software* reconhece as células e desenha para cada espermatozóide uma seqüência completa do movimento para reconstituir sua trajetória, classificando-a conforme os padrões definidos como: móvel não progressivo, linear lento, linear rápido e imóvel (Mortimer, 2000).

Em seguida, uma série de outras características de movimento espermático é calculada, fornecendo parâmetros de motilidade como: porcentagem de móveis, velocidade curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). Estes valores são usados para diferenciar os padrões do movimento espermático (Mortimer, 2000).

Quando o CASA é usado, todos os espermatozóide em um campo de visão e suas trajetórias são reconstruídas simultaneamente. Todas as células espermáticas de um campo são identificadas e avaliadas antes que as imagens do próximo campo, captadas na seqüência, sejam analisadas (Donald *et al.*, 1988).

Parâmetros da motilidade espermática avaliados pelo CASA

De acordo com Versteegen *et al.* (2002) os parâmetros reportados pelo CASA são:

Velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$): É a velocidade da trajetória real do espermatozóide. É sempre a maior das três velocidades e serve como elemento de cálculo para a linearidade.

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

Velocidade média da trajetória (VAP- $\mu\text{m/s}$): é a velocidade da trajetória média do espermatozóide. Em casos onde a trajetória da cabeça espermática é muito regular e linear com pouco movimento lateral da cabeça, a VAP é quase a mesma que a VSL, porém com trajetórias irregulares, não lineares ou onde existe um alto grau de movimento lateral, a VAP será maior que a VSL.

Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH - μm): é a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozóide em sua trajetória real. A mensuração desse parâmetro está relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do óvulo, assim, a ALH é um dos parâmetros que tem efeito sobre a fertilização.

Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF- Hz): É o número de vezes que a cabeça do espermatozóide cruza a direção do movimento. Se existem mais batimentos/segundos que imagens/segundos, então, a BCF irá ser subestimada.

Retilinearidade (STR - %): É a relação percentual entre VSL e VAP. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta.

Linearidade (LIN - %): Relação percentual entre VSL e VCL, ou seja, é a porcentagem de célula que tem index linear > 0.7 , ângulo absoluto menor que 25° e ângulo algébrico menor que 3° . Quanto mais o espermatozóide se afasta da velocidade em linha reta, menor será sua linearidade (Mortimer, 2000).

Os valores de velocidade são determinados como percurso relevante percorrido em um período de tempo e são representados em $\mu\text{m/s}$, enquanto os valores de LIN, e STR são determinados como raio dos valores de velocidade (Amann e Katz, 2004).

Avaliação da hiperativação espermática

A hiperativação é um processo que o espermatozóide apresenta durante o seu progresso no oviduto da fêmea, sendo descrito como um movimento vigoroso, não progressivo, não linear e está relacionado com o processo de capacitação e fertilização (Verstegen *et al.*, 2002).

Durante a hiperativação, o padrão e o vigor da trajetória do espermatozóide são alterados, passando a ser caracterizados por uma larga amplitude do batimento flagelar, aumento médio do movimento lateral da cabeça e cauda do espermatozóide associados também com uma motilidade lenta ou não progressiva de baixa frequência de batimento flagelar (Mortimer e Mortimer, 1990; Suarez, 1996; Kay e Robertson, 1998; Verstegen *et al.*, 2002).

A mensuração objetiva desse processo fisiológico pode ser usada como biomarcador não apenas na predição da fertilidade, mas também na avaliação de agentes farmacológicos administrados para tratar infertilidade masculina e monitorar o efeito dos contraceptivos na função espermática (Kay e Robertson, 1998).

A avaliação da hiperatividade do espermatozóide utilizando o sistema CASA é possível a partir do uso de alta frequência. O uso de 60Hz permitiu melhor discriminação entre motilidade progressiva e motilidade hiperativada quando comparada a análises feitas a 30Hz (Mortimer e Swan, 1995, citado por Cancel *et al.*, 2000).

O uso da alta frequência de captação de imagens combinado com o aumento da resolução do sistema óptico e do uso de melhores computadores, tornaram eficiente o registro da trajetória dos espermatozóides com alta velocidade e trajetória irregular, que até então eram difíceis de ser analisados (Cancel *et al.*, 2000).

No sêmen humano, o espermatozóide hiperativado é aquele que apresenta: $VCL \geq 70\mu\text{m/s}$, $ALH \geq 7\mu\text{m}$, $LIN \geq 30\%$ e $VSL \geq 30\mu\text{m}$ (Mortimer e Mortimer, 1990; Verstegen *et al.*, 2002).

Avaliação da morfologia espermática

A classificação da morfologia do espermatozóide tem se tornado uma parte integral da rotina da análise de sêmen. A razão disso é que a morfologia espermática é um importante indicador de fertilidade, tanto em homens como em animais, além de ser um bom indicador para danos espermáticos consequentes de agentes físicos ou químicos (Verstegen *et al.*, 2002; Garcia-Herreros *et al.*, 2006).

Segundo Hirai *et al.* (2001), a análise automática da morfometria espermática tem sido aplicada em várias espécies incluindo a bovina (Gravance *et al.*, 1996), a caprina (Gravance *et al.*, 1995), a ovina (Gravance *et al.*, 1998) e a humana (Davis e Katz, 1993).

Esses sistemas são programados para classificar objetos e diferenciar imagens das células espermáticas do detrito seminal e/ou superposição de células, medindo parâmetros como diâmetro máximo, diâmetro mínimo, área da cabeça, porcentagem de acrosso (obtido dividindo área do acrosso pela área da cabeça) e fator de elipse (obtido dividindo-se o diâmetro mínimo da cabeça pelo máximo), que são utilizados para classificar as células segundo sua forma em: normal (formato de cabeça regular), afilada, redonda, macro, micro ou amorfo (cabeça irregular).

Mesmo sendo uma avaliação objetiva, o sistema CASA apresenta variação nos resultados entre 11 e 23%, o que pode ser atribuída a fatores como preparação da amostra incluindo técnica de fixação e técnica de

coloração, bem como fatores como correta iluminação, foco, aumento, sistema de classificação, interpretação e experiência do profissional (Hirai *et al.*, 2001; Versteegen *et al.*, 2002).

CASA e avaliação da fertilidade

A habilidade do espermatozóide para migrar através do trato reprodutivo da fêmea e penetrar no oócito depende da resistência exercida pela secreção presente no trato genital feminino e do potencial hidrodinâmico conferido pela curvatura flagelar. Sua força de propulsão é definida pelas propriedades cinemáticas dessas células, o que pode levar a diferenças na eficiência de migração entre espermatozóides de alguns machos (Cox *et al.*, 2006).

A motilidade espermática é comumente apontada como uma das mais importantes características associadas com a habilidade fertilizante do espermatozóide (Cox *et al.*, 2006), porém, quando mensurada microscopicamente, não é bem correlacionada com a fertilização *in vivo* ou *in vitro*, pois além do erro humano durante a avaliação subjetiva desse parâmetro, existe ainda a limitação do método para avaliar detalhadamente as características do movimento espermático (Liu *et al.*, 1991).

Nos últimos anos, os sistemas de avaliação automática têm mostrado ser uma ferramenta útil na avaliação das propriedades cinemáticas do espermatozóide de forma individual do ejaculado, mostrando grande potencial para prever a fertilidade do macho, por meio da correlação da velocidade de natação do espermatozóide com a fertilização de oócito *in vitro* e *in vivo* (Cox *et al.*, 2006).

Na tentativa de correlacionar os parâmetros do CASA com a taxa de fertilização, verificou-se que os valores de VAP, VSL e VCL são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócitos fertilizados do que naquelas onde a taxa de fertilização de oócito é menor que 50% (Versteegen *et al.*, 2002). Amostras com elevados valores desses parâmetros de velocidade e de LIN e BCF apresentam melhor migração e penetração no muco cervical (Mortimer, 2000; Versteegen *et al.*, 2002).

Entretanto, entre os parâmetros cinemáticos fornecidos pelo o CASA, a VCL e a ALH têm mostrado grande correlação com taxa de fertilização pela maioria dos estudos. Parâmetros como BCF e LIN têm revelado correlação positiva com a taxa de prenhez em alguns estudos, mas correlação negativa em outros (Versteegen *et al.*, 2002).

Espermatozóides humanos com boa capacidade de penetração no muco cervical apresentam um grupo de propriedades cinemáticas semelhantes a: VAP = 25µm/s e ALH = 4,5µm (Mortimer, 2000) enquanto, em caprinos, espermatozóides com velocidade eficiente na migração do muco cervical *in vitro* apresentam LIN > 50% e ALH = 4,8µm (Cox *et al.*, 2006).

Outro parâmetro preditivo de fertilidade é a porcentagem de espermatozóides móveis. Em varrões com leitegadas maiores que 10 leitões, foi observado alta porcentagem de espermatozóides móveis, cerca de 93%, enquanto em varrões, com tamanho de leitegada menor, a porcentagem de espermatozóides móveis registrado foi em torno de 80% (Hirai *et al.*, 2001).

Fatores que influenciam a análise automática

Vários fatores podem gerar uma variabilidade na estimativa dos parâmetros das características dos espermatozóides mensurados pelo CASA, entre os quais podem-se citar: experiência do observador, identificação da espécie, acurácia da câmara utilizada, temperatura de análise, tempo entre a colheita da amostra e sua análise, método de processamento da amostra, instrumento usado, concentração espermática e frequência de aquisição de imagens (Davis e Katz, 1993; Farrel *et al.*, 1996; Mortimer, 2000).

Experiência do observador

É importante que o observador seja treinado e experiente para reconhecer e desconsiderar dados de velocidade de movimento resultante de alterações momentâneas que porventura possam ocorrer (Versteegen *et al.*, 2002).

O observador deve ter habilidade para perceber que o sistema pode não diferenciar a cabeça do espermatozóide de outras células ou detritos, eventualmente presentes na amostra avaliada, nesses casos, as estimativas podem ser verificadas manualmente por ele a fim de se evitar que dados de concentração espermática e porcentagem sejam superestimados e inseguros (Mortimer, 2000).

Identificação da espécie

O sistema apresenta uma configuração diferente para cada espécie, assim o primeiro passo é fazer a identificação correta da espécie e da amostra porque parâmetros estabelecidos para a análise de sêmen puro, por exemplo, difere do sêmen lavado ou descongelado, da mesma forma que os parâmetros estabelecidos para a espécie suína diferem da usada para a bovina. Baseado nisso, as características de motilidade não devem ser

vistas como valores absolutos, devendo ser interpretados de acordo com parâmetros estabelecidos (Verstegen *et al.*, 2002).

Acurácia da câmara utilizada

A profundidade da câmara pode afetar a estimativa da concentração ou influenciar a expressão de motilidade por restringir o deslocamento ou por levar à interações das células com as suas paredes (Verstegen *et al.*, 2002). Assim, ela deve ser profunda o suficiente para que o padrão de motilidade seja avaliado (Kay e Robertson, 1998).

Temperatura de análise

A temperatura influencia a motilidade do espermatozóide,. baseados nisso, estudos em diferentes espécies foram realizados para determinar qual a temperatura ideal para se realizar as análises no sistema CASA, sendo recomendada por vários autores, a temperatura corporal de 37 e 38 °C para algumas espécies (Verstegen *et al.*, 2002).

Efeito da concentração

A concentração espermática também tem influência nos resultados do CASA. Estudos com sêmen humano e de animais têm demonstrado que o sistema CASA não é eficaz para avaliações de amostras espermáticas com alta ou baixa concentração, assim para uma correta análise, a concentração espermática deve estar entre 20 a 50 x10⁶/ml (Budworth *et al.*, 1987; Davis e Katz, 1993).

Efeito da diluição e diluidores

O efeito das soluções de diluição sobre os parâmetros de cinética tem sido pouco estudado, mas tem sido demonstrado que a diluição e o tipo de meio diluidor podem afetar a análise de motilidade (Farrel *et al.*, 1996). Por exemplo, gotículas de lipídeos da gema de ovo podem ser contadas se estas possuem a mesma dimensão da cabeça de um espermatozóide..

Efeito do tempo entre a colheita da amostra e sua análise

Com relação à influência do tempo de incubação, Farrel *et al.* (1996),verificaram o declínio na velocidade espermática durante incubação de 2 horas, registrando redução de 3-6% na porcentagem de espermatozoides móveis em amostras de sêmen humano e de camundongo. O mesmo foi observado avaliando sêmen resfriado de bovino (Tardif *et al.*, 1997) e de suíno (Holt *et al.*,1997). Assim, é aconselhável que a avaliação da amostra seja realizada em um curto período de tempo após colheita ou processamento a fim de evitar erros de leitura por subestimar parâmetros de motilidade e de velocidade.

Efeito da frequência de aquisição de imagens

Segundo Mortimer *et al.* (1988 citado por Kraemer *et al.*, 1998), a frequência de aquisição de imagens também é importante. Mortimer (2000), demonstrou que a reconstrução da trajetória pode ser influenciada pelo número de imagens capturadas por segundo, assim, algumas trajetórias podem parecer simples quando reconstituídas a 30 imagens/segundo, mas complexas quando reconstituídas a 60 imagens/segundo. Isso ocorre porque o aumento da frequência de captura de imagens resulta em mais informações da trajetória afetando o aspecto do movimento espermático.

Davis e Katz (1993) demonstraram que em baixa frequência de aquisição de imagens, erros nos valores médios de ALH, LIN, VCL e BCF eram de 0,9, 57, 33 e 33% respectivamente, mas quando a frequência foi aumentada para 60 Hz os erros eram reduzidos para 0,05, 11, 9,5 e 8.9%, respectivamente, assim, uma melhora significativa na acurácia das avaliações foi encontrada quando a frequência de aquisição foi aumentada de 30 para 60Hz.

Segundo Mortimer e Swan (1995), citados por Cancel *et al.*, (2000), o uso de 60Hz, permite uma melhor discriminação entre a motilidade progressiva e a motilidade hiperativada em espermatozóide humano quando comparado a análises feitas a 30Hz.

Métodos de processamento

Processos como lavagem, capacitação, congelamento, descongelamento, diluição e resfriamento têm efeito substancial sobre os parâmetros analisados, o que pode levar a variabilidade de resultados nas amostras avaliadas

antes e depois de diferentes tratamentos, assim, o avaliador deve considerar essas observações ao interpretar os resultados obtidos.

Tardif *et al.* (1997) verificaram o aumento do deslocamento lateral da cabeça espermática após resfriamento do sêmen bovino. Mack *et al.* (1988), verificaram melhora em todos os parâmetros cinemáticos, exceto LIN, após lavagem do sêmen humano.

Um estudo na espécie suína, comparando análises de sêmen fresco e descongelado, mostrou não existir diferença significativa entre elas em relação aos dados de ALH, BCF, STR e LIN, mas verificou uma queda da motilidade total de 93% para 51% e da motilidade progressiva de 64 para 21%, provocados pela criopreservação (Eriksson e Rodriguez-Martinez, 2000).

Controle de qualidade e validação

Para que ocorra o desenvolvimento dessa tecnologia e seja possível a comparação, a interpretação e a reprodução de resultados, muitos autores têm mencionado a necessidade da padronização de procedimentos para manipulação do sêmen. Embora várias modificações no procedimento sejam necessárias para diferentes espécies, os princípios para as avaliações da qualidade espermática utilizando o CASA são similares para todas as espécies de mamíferos (Farrel *et al.*, 1996; Amann e Katz, 2004; Garcia-Herreros *et al.*, 2006).

As amostras de sêmen com concentrações maiores do que a recomendada pelo fabricante devem ser diluídas a concentrações entre 20-50 x 10⁶ espermatozoides/mL, mas diluidores a base de leite ou gema de ovo, que contem partículas com tamanho similar a cabeça do espermatozoide, devem ser evitados, porque não são diferenciadas dos espermatozoides imóveis (Verstegen *et al.*, 2002).

Todas as análises devem ser realizadas a temperatura fisiológica de cada espécie, a câmara deve ter profundidade adequada, com no mínimo 10µm de profundidade e avaliações básicas de sêmen podem ser feitas a 30Hz, mas as amostras com espermatozoides mais rápidos devem ser avaliadas a 60Hz (Davis e Katz, 1993; European Society of Human Reproduction and Embryology - ESHRE, 1998).

Após a análise, o usuário deve verificar se todos os espermatozoides móveis no campo de visão tiveram suas trajetórias reconstruídas e é recomendado fazer uma avaliação comparativa entre a análise automática e a subjetiva (Eshre, 1998; Verstegen *et al.*, 2002). Mesmo com essas recomendações gerais, até que seja desenvolvido um apropriado procedimento de controle de qualidade e métodos de calibração do instrumento CASA, a comparação de resultados entre laboratórios será limitada (Davis e Katz, 1993).

Considerações finais

Nos últimos anos, tem sido rápido o desenvolvimento de equipamentos e procedimentos para facilitar a análise automatizada de espermatozoides. O CASA permite uma mensuração objetiva de diferentes características da célula espermática, mostrando alto nível de precisão e segurança, sendo atualmente utilizado como uma ferramenta para melhorar o nosso conhecimento e habilidade para manipular espermatozoides, abolindo a subjetividade das análises realizadas pelo método convencional.

A futura uniformização e a padronização desse instrumento darão a oportunidade de analisar, objetivamente, resultados de motilidade e morfometria espermática, definindo universalmente valores aceitos como normais e dando subsídio para melhorar a aplicação das biotécnicas da reprodução.

Agradecimentos

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo suporte financeiro.

Referências

- Amann R, Katz DF.** Reflections on CASA after 25 years. *J Androl*, v.25, p.317-325, 2004.
- Amann RP, Hammerstedt RH.** Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol Reprod*, v.23, p.6478-645, 1980.
- Budworth PR, Ammann RP, Hamersted RH.** A microcomputer photographic method for evaluation of motility and velocity in bull sperm. *J Dairy Sci*, v.70, p.1927-1936, 1987.
- Cancel A, Lobdell D, Mendolo P, Perreault D.** Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. *Hum Reprod*, v.15, p.1322-1328, 2000.
- Cox JF, Alfaro V, Montenegro V, Rodriguez-Martinez H.** Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology*, v.66, p. 860-867, 2006.
- Davis RO, Katz DF.** Operational standards for CASA instruments. *J Androl*, v.14, p.385-395, 1993.
- Donald TS, Hickman R, Hoskins DD.** Description, validation and performance characteristic of a new computer-automated sperm motility analysis system. *Biol Reprod*, v.38, p.577-586, 1988.

- Eriksson BM, Rodriguez-Martinez H.** Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen. *Anim Reprod Sci*, v.63, p.205-220, 2000.
- European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE).** Andrology Special Interest Group. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Hum Reprod*, v.13, p.142-145, 1998.
- Farrel PB, Foote RN, Mcardle MM, Trouern-Trend VL, Tardif AL.** Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *J Androl*, v.17, p.293-300, 1996.
- Garcia-Herreros M, Aparicio IM, Baron FJ, Garcia Martin LJ, Gil MC.** Standardization of samples preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *Int J Androl*, v.29, p.553-563, 2006.
- Gravance CG, Champion ZJ, Casey PJ.** Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.49, p.1219-1230, 1998.
- Gravance CG, Lewis KM, Casey PJ.** Computer automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. *Theriogenology*, v.44, p.989-1002, 1995.
- Gravance CG, Liu IKM, Davis RO, Hughes JP, Casey PJ.** Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.108, p.41-46, 1996.
- Hirai M, Boersma A, Hoeflich A, Wolf E, Foll J, Aumuller R, Braum J.** Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *J Androl*, v.22, p.104-110, 2001.
- Holt C, Holt W, Moore HDM, Reed HCB, Curnock RM** Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trial. *J Androl*, v.18, p.312-323, 1997.
- Iguer-Ouada M, Verstegen J.** Evaluation of the Hamilton-Thorn computer based automated system for dog semen analysis. *Theriogenology*, v.55, p.733-749, 2001.
- Liu DY, Clarke GN, Baker WG.** Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates *in vitro*. *J Androl*, v.12, p.231-239, 1991.
- Kay VJ, Robertson L.** Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological functions and application in assisted reproduction. *Hum Reprod*, v.4, p.776-786, 1998.
- Kraemer M, Fillion C, Martin-Pont B, Auger J.** Factors influencing human sperm kinematic measuring by the celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Hum Reprod*, v.13, p.611-619, 1998.
- Mack SO, Wolf DF, Tash JS.** Quantitation of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. *Biol Reprod*, v.38, p.270-281, 1988.
- Mortimer ST.** Casa- Practical aspects. *J Androl*, p.515-524, 2000.
- Mortimer ST, Mortimer D.** Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J Androl*, v.11, p.195-203, 1990.
- Suarez SS.** Hyperactivated motility in sperm. *J Androl*, v.17, p.331-334, 1996.
- Tardif AL, Farrel PB, Trouern-Trend V, Foote RH.** Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *J Dairy Sci*, v.80, p.1606-1612, 1997.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K.** Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.
-