

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

LUIS GUSTAVO FREITAG DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE ESPERMIODENSÍMETRO VISANDO A
PREDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SÊMEN EQUINO**

(Development of a sperm densimeter aiming a prediction of concentration of
equine semen)

CURITIBA

2016

LUIS GUSTAVO FREITAG DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE ESPERMIODENSIMETRO VISANDO A
PREDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SÊMEN EQUINO**

(Development of a sperm densimeter aiming a prediction of concentration
of equine semen)

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, área de
concentração Saúde, Tecnologia e
Produção Animal, da Escola de
Ciências da Vida da Pontifícia
Universidade Católica do Paraná,
para obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ernandes
Kozicki

CURITIBA

2016

TERMO DE APROVAÇÃO
(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)

(Entregue pela secretaria)

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA.....	V
AGRADECIMENTOS	VI
FORMATO DA DISSERTAÇÃO	VII
RESUMO GERAL	VIII
ABSTRACT	X
CAPÍTULO 1	1
CONTEXTUALIZAÇÃO	1
CAPÍTULO 2	5
ARTIGO (DESENVOLVIMENTO DE ESPERMIODENSÍMETRO VISANDO A PREDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SÊMEN EQUINO)	5
RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAIS E MÉTODOS	8
2.1. DESENVOLVIMENTO DOS PROTÓTIPOS	8
2.2. COLETA DE DADOS	9
2.3. ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA	10
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4. CONCLUSÃO.....	20
5. REFERÊNCIAS	20
CAPITULO 3	22
CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
REFERÊNCIAS	23
ANEXO.....	26

Dedico à Deus, aos meus amigos e família, em especial a Giovanna Polo por dar suporte incondicional nesta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha namorada Giovanna Polo por sempre estar ao meu lado durante o projeto e todos os bons e maus momentos compartilhados, pois sem ela a conclusão não seria possível.

Agradeço a minha família por todo suporte e compreensão durante essa etapa

Agradeço aos meus amigos Rafaela, Pedro, Giovana por toda a ajuda durante o projeto.

Agradeço a Kassy, Beth, Mayra, Ionara pelo alívio e amizade que proporcionaram durante essa jornada.

Agradeço aos proprietários que cederam seus animais para realização do experimento.

Agradeço a todos envolvidos durante a coleta de dados que nos doaram uma parte de seu tempo para que fosse possível a realização deste trabalho.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral, a contextualização do tema, justificativa e os objetivos de estudo.

O capítulo 2 trata de um artigo científico completo e na íntegra, formatado nas normas da revista para o qual será submetido (Theriogenology).

O capítulo 3 finaliza a dissertação com conclusões gerais e considerações finais com proposição de sugestões para estudos futuros.

Ao final do capítulo 3 todas as referências utilizadas na dissertação encontram-se referenciadas.

RESUMO GERAL

O agronegócio relativo ao cavalo vem se tornando cada vez mais forte no Brasil e o número de equinos aumentou em relação a 2013. Estima-se que o montante movimentado pelo mercado equino seja por volta de R\$13 bilhões/ano, somando-se os cavalos voltados ao lazer e os para a lida à campo. Parte desse montante é empregado para o uso de biotecnologias, medicamentos e nutrição. As biotecnologias da reprodução servem para melhorar o desempenho reprodutivo dos equinos bem como facilitar e ampliar a disseminação de material genético de animais superiores. Dentre as biotecnologias mais utilizadas atualmente encontram-se a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE), sendo que a IA acelera a difusão do material concernente ao macho e é a mais viável economicamente. A concentração do sêmen é uma característica muito evidente a ser considerada em programas de IA. Em bovinos e suínos o espermiométrico de Karras é rotineiramente usado em centrais de inseminação por ser um método de baixo custo e de elevada praticidade. Porém esse modelo (Karras) não é validado para a leitura da concentração de sêmen equino. O presente estudo objetivou o desenvolvimento de um espermiométrico para a leitura da concentração de sêmen de garanhões, de maneira prática e eficiente, como método alternativo à câmara de Neubauer (técnica padrão, universalmente aceita), em condições à campo, pois a contagem manual consome tempo e geralmente há a necessidade de várias leituras. Foram desenvolvidos dois modelos de espermiométrico, sendo um com ângulo de abertura de 8 graus (Modelo 8) e outro com 10 graus (Modelo 10). Utilizaram-se 123 amostras de sêmen de garanhões de diversas raças (Crioula, Quarto-de-milha e Apaloosa) para a leitura e calibragem de dois modelos protótipos de espermiométrico por dois avaliadores. Os valores das concentrações obtidos pela câmara de Neubauer foram comparados aos valores obtidos das leituras das escalas de cada modelo, utilizando-se a regressão linear para a criação da escala de concentrações para cada modelo. Adicionalmente foi calculada a correlação entre as escalas desenvolvidas para cada um dos modelos e os valores checados na câmara de Neubauer. A regressão linear mostrou uma precisão nos ajustes das curvas de concentrações com valores de $R^2 = 0,9395$ para o Modelo 8 e $R^2 = 0,9418$ para o Modelo 10. As correlações com as concentrações foram significativas ($p < 0,0001$),

elevadas e negativas, sendo -0,83 para o Modelo 8º e -0,80 para o Modelo 10º, evidenciando uma forte relação entre os menores números das escalas com altas concentrações celulares e dos maiores números das escalas com baixas concentrações, grandezas estas, inversamente proporcionais. Concluiu-se que os espermiométricos desenvolvidos no presente estudo são eficazes na avaliação da concentração do sêmen de equinos, podendo ser utilizados na prática rotineira da reprodução equina, por constituir instrumento prático, de rápida leitura e de baixo custo. Os modelos desenvolvidos no presente estudo, estão protegidos pelo depósito de Patente de Invenção junto ao INPI/BR em 17 de agosto de 2016, com a numeração: BR 10 2016 019032 0, seguindo-se os trâmites nacionais.

Palavras-chave: Espermiométrico, Concentração, Neubauer, Sêmen, Equinos, Praticidade.

ABSTRACT

Horse agribusiness is becoming increasingly strong in Brazil and the number of horses increased compared to the year of 2013. It is estimated that the amount moved by the horse market is around 13 billion reais per year when adding horses aimed at leisure and aimed at dealing in the field. Part of this amount is spent for the use of biotechnologies, medicine and nutrition. The reproduction biotechnologies serve to improve the reproductive performance of horses and to facilitate and expand the dissemination of genetic material of animals of higher quality. Among the most used biotechnologies are artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET), and IA accelerates the diffusion of the genetics of the male and it is more economically viable. The sperm concentration is a very important factor to consider in an AI program for horses. In cattle and pigs, the use of Karras sperm densimeter is routine in insemination centers because it is a cheap and high convenience method. However, this model (Karras) is not validated for evaluating equine sperm concentration. In this study we aimed to create a sperm densimeter for analysing semen of stallions in a practical and efficient manner, as an alternative method to the Neubauer chamber (standard technique, universally accepted) to be used in field conditions, as the manual counting is time consuming and several countings are often necessary. Two models of sperm densimeter were developed, one with an 8-degree opening (Model 8) angle and the other with 10 degrees (Model 10). We used 123 samples of semen from stallions of various breeds (Criollo, Quarter-horse and Apaloosa) to evaluate and calibrate 2 sperm densimeter prototypes, with samples being analyzed by two evaluators. The values obtained with Neubauer chamber were compared to the values obtained from the scales of each sperm densimeter model, using linear regression to establish the scale of concentrations for each model. Additionally, it was calculated correlation between the scales developed for each model and the values found in Neubauer chamber. Linear regression showed a precision of adjustment in curves of concentrations, with $R^2 = 0.9395$ the Model 8 and $R^2 = 0.9418$ the Model 10. The correlations with the concentrations were significant ($p < 0.0001$), high and negative, being -0.83 for the Model 8 and -0.8 for the Model 10, which indicates a strong relationship between the minor numbers of the scale with high concentrations and between higher numbers of the scale with low concentrations, these being inversely proportional.

We concluded that the sperm densimeters developed in this study are capable of evaluating stallion sperm concentration and it can be used in routine practices of equine reproduction, due to its practicality, fast analysis and low cost. The prototypes developed in this study are protected with Patent of Invention in INPI/BR, deposited in August 17th, 2016, with number: BR 10 2016 019032 0, following national formalities.

Keywords: Sperm densimeter, Concentration, Neubauer, Semen, Horses, Practicality

CAPITULO 1

CONTEXTUALIZAÇÃO

O agronegócio do cavalo vem se fortalecendo no Brasil, aumentando o número de equinos em 2,6% relativamente ao ano de 2013, totalizando em 2014 aproximadamente 5,45 milhões de cabeças distribuídas de forma distinta entre as regiões Sudeste (24,2%), Nordeste (22,9%), Centro-Oeste (19,2%), Sul (17,7%) e Norte (16,1%) [1].

Estima-se que 3.900.000 animais são usados para a lida no campo, e o montante movimentado no ano para essa parcela corresponde a R\$ 7.95 bilhões. O setor de esporte e lazer totalizam um número de animais próximo a 1.100.000 cabeças, bastante menor, se comparado aos animais de lida. Porém o setor de esporte e lazer movimenta aproximadamente R\$ 5,84 bilhões ao ano. Animais de lazer consomem mais rações, medicamentos e outros produtos e serviços de maior valor, se comparado aos cavalos de lida [2].

O uso de biotecnologias reprodutivas vem contribuindo para acelerar o melhoramento genético por meio do incremento das taxas de fertilidade da espécie equina, visto que esta, fisiologicamente apresenta índices inferiores a outras espécies pecuárias. Isto se deve ao fato da fertilidade nunca ter sido referenciada como prioridade na espécie, tendo sido preterida em função de outros parâmetros como morfologia, desempenho em atividades funcionais como provas de marcha, salto, etc. [3,4]

Dentre as biotecnologias de maior uso atualmente encontram-se a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE) [5], sendo que a IA acelera a difusão do material do reprodutor e é a mais viável economicamente [3, 6, 7]. Existe uma alta taxa de utilização dessas biotecnologias em raças voltadas ao esporte como é o caso da raça Brasileiro de Hipismo (BH) por exemplo, o que indica alta preocupação com a obtenção de resultados cada vez melhores, tanto reprodutivos quanto em desempenho esportivo. A inseminação artificial (IA) tem se difundido entre os haras e criadores com objetivo de melhorar a qualidade genética dos animais produzidos e apresentar produtos de maior variabilidade genética no mercado, pois possibilita utilizar garanhões geneticamente superiores, mesmo esses estando a uma grande distância das éguas a serem trabalhadas [5].

A obtenção de boas taxas de prenhez depende, além de outros fatores, da variação individual entre garanhões [8]. Dentre os fatores que podem alterar os índices reprodutivos, a qualidade seminal assume um efeito considerável [9]. Portanto, o garanhão desempenha um importante papel na cadeia da equideocultura e deve apresentar adequado potencial de fertilidade [3]. Outro fator que deve ser considerado é a possibilidade de transmissão de doenças congênitas ou hereditárias que podem ser transmitidas para a prole e causar efeitos negativos no desempenho reprodutivo [10].

Para a obtenção de um bom resultado na reprodução deve-se fazer uso de exames para atestar a saúde reprodutiva do garanhão. Para isso, é necessário examinar tanto a genitália interna quanto a externa do garanhão, pois se detectado alguma irregularidade seriam os primeiros aspectos a se trabalhar para corrigir uma possível infertilidade ou subfertilidade. O mínimo que se deve fazer quando se acompanha o animal é o exame físico completo e a avaliação do sêmen [10].

A fertilidade varia entre os garanhões, mesmo quando estes reúnem as qualidades seminais mínimas. Assim vários métodos laboratoriais para avaliação do sêmen vêm sendo utilizados. Embora cada uma das análises seminais (motilidade, morfologia, concentração, entre outros) seja importante, elas não devem ser utilizadas isoladamente para predizer o potencial fecundante do garanhão. Estas, em conjunto, podem ajudar a predizer seu potencial fecundante, ou a falta de potencial [10,11].

As análises seminais realizadas com o intuito de avaliar o potencial de fertilidade dos indivíduos, são feitas a partir de coletas para avaliação da qualidade seminal. A cada coleta, o sêmen é avaliado quanto às suas características macroscópicas de volume, coloração, viscosidade e aspecto [3, 10]. Motilidade, concentração e morfologia espermáticas são os parâmetros clássicos na avaliação microscópica de amostras de sêmen (fresco, refrigerado ou congelado) [3,10,11, 12].

A concentração do sêmen do macho destinado à reprodução é outro fator que deve ser considerado, cuja estimativa deve ser precisamente determinada para a eficiência de um programa de IA [13], especialmente quando o intuito é usar um ejaculado para inseminar considerável número de éguas [12]. A concentração espermática é essencial para determinar o número total de espermatozoides no

ejaculado e, a partir desse número, calcula-se a quantidade de espermatozoides viáveis do ejaculado e o número de doses de sêmen [14].

A forma direta de contagem com o uso da câmara de Neubauer é a técnica padrão, porém é demorada e necessita de várias mensurações de cada amostra para se obter uma boa precisão, apresentando margem de erro variando de 23% a 73% entre laboratórios, e em média de 15,2% entre técnicos. Estudos reportam que este tipo de análise é imprecisa, mesmo quando executada por investigadores experientes [15,16], pois as análises são influenciadas por uma alta variação entre observações e observadores. Essa variação é maior em concentrações baixas e menor em concentrações altas[16]. Esta imprecisão deriva, em parte, da necessidade de manipulação da amostra, com pipetagem, diluição, preenchimento da câmara e contagem manual [17]. Dessa forma, mesmo sendo a câmara de Neubauer considerada a técnica padrão [18], devem-se ter em mente as vantagens e as desvantagens de seu uso.

Com o propósito de obter técnicas que apresentem maior repetibilidade tanto para avaliar a morfologia quanto à função espermática, diversos sistemas que utilizam a análise computadorizada de imagens têm sido desenvolvidos e empregados nos últimos anos [19,20].

O CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) é um sistema automático (hardware e software) utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas e precisas do movimento individual de cada célula bem como de subpopulações de células espermáticas. Este equipamento também pode ser utilizado para mensurar o número de células por unidade de volume [21].

Porém, sua eficácia tem sido melhor comprovada para avaliação de motilidade e morfologia. A mensuração de concentração espermática com o CASA ainda é difícil em todas as espécies, pois pode ocorrer superestimação, o que é um problema para amostras pouco concentradas [22, 23]. É constatado que, em relação ao método padrão (Neubauer), o CASA tem uma grande variação ($12,1 \pm 42,2\%$) quando não são utilizados corantes especiais, superestimando ou subestimando a quantidade de células nas amostras, mesmo em se tratando de um teste objetivo [17].

Em medicina veterinária, no entanto, o CASA ainda não é uma prática rotineira em Centrais de Reprodução, pois embora o sistema tenha muitas vantagens, seu uso se torna limitado devido ao elevado custo do equipamento [24].

O espermiométrico de Karras oferece estimativa rápida da concentração espermática, com base no grau de turbidez ou densidade do ejaculado. Em suínos esta técnica superestima a concentração em relação à câmara de Neubauer, mas ainda assim é utilizada com frequência, assim como em bovinos, por ser um método rápido e barato [13, 25]. Em bovinos os métodos mais utilizados para mensuração da concentração do sêmen são a câmara de Neubauer, o espectrofotômetro e o espermiométrico de Karras. Essas técnicas apresentam diferenças na agilidade e velocidade de execução e no custo de aquisição, sendo que o espermiométrico acaba se sobressaindo por sua alta confiabilidade e praticidade, se comparado à Neubauer e por seu baixo custo se comparado ao espectrofotômetro[25]. Não existe literatura para a avaliação da concentração de sêmen equino com espermiométrico, visto que o modelo de Karras não foi desenvolvido para efetuar avaliação de concentração nessa espécie; assim, a carência de informações e a necessidade de se avaliar o grau de precisão desperta o interesse na averiguação, pois a técnica já vem sendo testada em outras espécies como bovinos e suínos [13, 25, 26].

O presente estudo teve como objetivos o desenvolvimento e a calibragem de um espermiométrico para equinos, capaz de mensurar a concentração do sêmen de garanhões como método alternativo ao uso da câmara de Neubauer para as condições à campo.

CAPITULO 2

(Artigo científico a ser submetido para publicação no periódico
Theriogenology)

DESENVOLVIMENTO DE ESPERMIODENSÍMETRO VISANDO A PREDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SEMEN EQUINO

Resumo

A concentração espermática é um fator muito importante a ser considerado em um programa de inseminação artificial (IA) para equinos. O presente estudo objetivou o desenvolvimento de um espermiodensímetro para a leitura da concentração de sêmen de garanhões, de maneira prática e eficiente, como método alternativo à câmara de Neubauer (técnica padrão) para condições à campo, pois o espermiodensímetro de Karras não foi desenvolvido visando a leitura de sêmen de garanhões. Foram desenvolvidos 2 modelos de espermiodensímetro, um com ângulo de abertura de 8 graus (Modelo 8) e outro com 10 graus (Modelo 10). Utilizaram-se 123 amostras de sêmen de garanhões de diversas raças (Crioula, Quarto-de-Milha e Apaloosa), para avaliar e calibrar (tomando por base a câmara de Neubauer) dois modelos de espermiodensímetro, sendo as amostras analisadas por dois avaliadores. Os valores obtidos foram pareados aos valores encontrados na câmara de Neubauer, utilizando-se a regressão linear (R^2) para a criação da escala de concentrações para cada modelo. Adicionalmente foi calculada a correlação entre as escalas desenvolvidas e os valores encontrados na câmara de Neubauer. A regressão linear revelou uma precisão nos ajustes das curvas de concentrações com valores de $R^2 = 0,9395$ para o Modelo 8, e $R^2 = 0,9418$ para o Modelo 10. As correlações com as concentrações foram significativas ($p < 0,0001$), elevadas e negativas, sendo $-0,83$ para o Modelo 8° e $-0,80$ para o Modelo 10°, evidenciando robusta relação entre os menores números da escala com elevadas concentrações celulares e dos maiores números com baixas concentrações, grandezas estas, inversamente proporcionais. Concluiu-se que os espermiodensímetros desenvolvidos no presente estudo são eficazes na avaliação da concentração do sêmen de equinos, podendo ser utilizados na prática rotineira da reprodução equina, confirmando os propósitos do presente estudo. Os modelos

desenvolvidos foram protegidos pelo depósito de Patente de Invenção junto ao INPI/BR em 17 de agosto de 2016, sob a numeração: BR 10 2016 019032 0, seguindo tramitação nacional.

Palavras-chave: Espermiométrico, Concentração, Neubauer, Sêmen, Equinos, Praticidade.

Abstract

The sperm concentration is a very important factor to consider in an artificial insemination program (AI) for horses. In this study we aimed to create a sperm densimeter for evaluating semen of stallions in a practical and efficient manner, as an alternative method to Neubauer chamber (standard technique) in field conditions, since Karras sperm densimeter was not developed to evaluate stallion semen. Two sperm densimeter models were developed, one with an 8-degree opening angle (Model 8) and the other with 10 degrees (Model 10). We used 123 samples of semen from stallions of various breeds (Criollo, Quarter-horse and Apaloosa) for evaluate and calibrate (based on Neubauer chamber) 2 sperm densimeter prototypes, with samples being analyzed by two evaluators. The values obtained were pooled to the values found in Neubauer chamber, and linear regression was used to establish the scale of concentrations for each model. Additionally, it was calculated correlation between the scales and the values found in Neubauer chamber. Linear regression showed a precision of adjustment of concentration curves, with $R^2= 0.9395$ for the Model 8, and $R^2= 0,9418$ for the Model 10. The correlations with the concentrations were significant ($p < 0.0001$), high and negative, being -0.83 for the Model 8 and -0.8 for the Model 10, which indicates a strong relationship between the minor numbers of the scale with high concentrations and between higher numbers of the scale with low concentrations, these being inversely proportional. We concluded that the developed sperm densimeters are effective on evaluating stallion sperm concentration, and the models can be used in routine practices of equine reproduction, confirming the study purposes. The sperm densimeter models developed in the present study were protected with patent deposit on INPI/BR in August 17 of 2016, under the code: BR 10 2016 129032 0, according to national formalities.

Keywords: spermdensimeter, concentration, Neubauer, semen, horses, practicality

1. Introdução

O uso de biotecnologias reprodutivas vem contribuindo para acelerar o melhoramento genético por meio do aumento da fertilidade da espécie equina, visto que esta, fisiologicamente apresenta índices inferiores a outras espécies pecuárias [1,2]. Dentre as biotecnologias de maior uso atualmente encontram-se a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE) [3], sendo que a IA acelera a difusão do material do reprodutor e é a mais viável economicamente [1,4,5]. A obtenção de boas taxas de prenhez depende, além de fatores como técnica e manipulação do sêmen, da variação individual entre garanhões [6]. Dentre os fatores que podem alterar os índices reprodutivos, a qualidade seminal assume um efeito significativo [7]. Com o intuito de se avaliar o potencial de fertilidade dos indivíduos, são realizadas coletas para avaliação da qualidade seminal. A cada coleta, o sêmen é avaliado quanto às suas características macroscópicas de volume, coloração, viscosidade e aspecto [1,8]. A concentração do sêmen destinado à reprodução é outra característica a ser considerada, cuja estimativa deve ser precisamente determinada objetivando o aumento da eficiência de um programa de IA [9], especialmente quando o intuito é usar um ejaculado em um grande número de éguas [10].

Na reprodução de bovinos os métodos mais comumente utilizados para determinar a concentração espermática são a câmara de Neubauer, o espermiométrico e o espectrofotômetro, sendo o espermiométrico de Karras considerado vantajoso sobre as demais técnicas por seu baixo custo e alta eficiência [11]. Em suínos, o espermiométrico é rotineiramente utilizado e tem sido comparado com outros métodos como a câmara de Neubauer e espectrofotômetro apresentando vantagens e desvantagens [9,12]. Apesar de sua praticidade e larga utilização em bovinos [11] e suínos [9,12], não existe um espermiométrico similar ao de Karras para equinos, que objetive a mensuração da concentração do sêmen.

Deste modo a hipótese do presente estudo foi a de que seria possível o desenvolvimento de um espermiométrico para se checar de maneira eficiente e célere, a concentração do sêmen de equinos à nível de campo.

O presente estudo teve como objetivo desenvolver espermiométricos com a capacidade de avaliação da concentração do sêmen de garanhões.

2. Materiais e Métodos

(Aprovação do comitê de ética da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, número 898).

2.1. Desenvolvimento dos protótipos

Inicialmente foi utilizado o espermiométrico de Karras (largamente utilizados para avaliação do sêmen de bovinos e suínos) visando executar a leitura com sêmen de garanhões (Lima LGF e Polo G. Observações não publicadas, 2013). O valor tabelado para bovinos ou suínos não correspondia ao encontrado na câmara de Neubauer ao realizar a contagem da amostra de equinos. Assim não foi possível executar a leitura. Ainda na tentativa de uso do espermiométrico de karras, num estágio mais avançado utilizou-se um fator de divisão para se chegar a um valor aproximado ao obtido pela câmara de Neubauer. Em testes à campo e com diferentes animais, foi verificado que quando o ejaculado possuía uma baixa concentração espermática, mesmo que ainda estivesse dentro dos padrões para a espécie, era inviável aplicar a leitura através do espermiométrico de Karras, pois este foi desenvolvido visando o sêmen de touros, cuja concentração espermática varia de 800-2000 milhões/mL, e sêmen de cachos, cuja concentração espermática varia de 200-300 milhões/mL [13]. Apesar da concentração espermática do cachaço ser próxima a do garanhão (150-300 milhões/mL) [13], existe uma grande variação individual, entre 50 a 400 milhões de espermatozoides por mL de ejaculado para a maioria dos garanhões [14].

A partir disso concebeu-se o plano do desenvolvimento de um espermiométrico específico para equinos, capaz de estabelecer leituras perante as mais diferentes concentrações, partindo-se da hipótese de que havendo mais espaço entre as paredes pelo aumento do ângulo, maior número de espermatozoides ocupariam aquele espaço, turvando assim a solução (sêmen mais água) e possibilitando a mensuração da concentração espermática através da leitura da turbidez.

Foram desenvolvidos vários protótipos de espermiômetros com diferentes angulações e dimensões, com o propósito de selecionar os mais adequados e consistentes com as leituras das mesmas amostras na câmara de Neubauer. Inicialmente foram prototipados modelos dentro de uma margem de 8°

e 15° de abertura. Dentro dessa margem, foram selecionados os modelos que melhor atendiam a condição de acomodar 11 mL de líquido, sendo que a coluna de líquido deveria atingir no mínimo, a altura da marcação do número 10, na escala impressa na face posterior do aparelho, para se obter um intervalo de calibração de 1 a 10. Desse modo os modelos selecionados para os testes à campo foram os modelos de 8° (Modelo 8) e 10° (Modelo 10).

Os protótipos dos espermiométricos desenvolvidos detêm o formato semelhante ao espermiométrico de Karras (acrílico, material transparente e incolor), dotado de uma escala na face posterior do frasco, com variação numérica ascendente de 0,5 em 0,5 cm. Diferentemente do modelo para bovinos e suínos, possui uma base para apoio sobre uma superfície plana e graus de abertura diferenciados. Um dos frascos possui ângulo de 8° (Modelo 8) e o outro frasco possui ângulo 10° (Modelo 10). Ambos utilizam uma diluição de 1mL de sêmen em 10mL de água, totalizando 11mL de solução, com homogeneização obrigatória. A leitura é feita de modo semelhante ao espermiométrico de Karras. O espermiométrico é segurado na base do frasco pelo observador, com o braço esticado, efetuando-se a leitura contra uma superfície clara, lendo-se o número em que a solução inicia a turvação, tornando anítida a visualização. A numeração impressa na face posterior promove uma leitura de 1 a 10. Altas concentrações tendem a turvar mais em baixo, próximas à marcação 1 e concentrações mais baixas tendem a turvar mais próximas ao 10.

2.2. Coleta de dados

Foram coletadas 123 amostras de sêmen de garanhão das raças Crioula, Quarto-De-Milha e Apaloosa, idade entre 3 e 20 anos, hípidos, utilizando-se o método da vagina artificial [10]. Os animais encontravam-se em propriedades localizadas na Região Metropolitana de Curitiba, situada no 25° 25 40 S e 49° 16 23 O, Paraná, Brasil e distantes em média 50km uma da outra. A alimentação dos reprodutores consistiu em feno de tifton, alfafa e água *ad libitum* e concentrado de acordo com cada indivíduo. Os animais permaneciam em baias durante a noite e livres em piquetes durante o dia. As coletas foram realizadas no período de um ano, dentro e fora da estação reprodutiva. Após a coleta, a fração gelatinosa era separada, mediante um filtro de sêmen (Filtro de sêmen, Minitub do Brasil LTDA., Porto Alegre/RS). Na sequência as amostras eram envasadas em tubos tipo Falcon de

15 mL para serem transportadas ao laboratório para análise da concentração espermática, com a Câmara de Neubauer [15] e com os espermiométricos desenvolvidos.

2.3. Análise de concentração espermática

Primeiramente as amostras foram avaliadas nos espermiométricos modelo 8 e modelo 10 (Figura 1).



Fig. 1. Modelos vazios de espermiométrico de 8º e 10º respectivamente.

A metodologia para realizar as leituras nos espermiométricos (Figura2) consistiu em diluir 1mL de sêmen em 10mL de água destilada dentro do próprio aparelho, totalizando 11mL de solução; em seguida, a solução era homogeneizada dentro do próprio aparelho tampando-se a abertura superior com o dedo polegar emborcando o frasco para baixo e para cima em movimentos leves. Depois da homogeneização, o avaliador se posicionava à cerca de 1,0 metro de uma superfície branca (parede), segurando o espermiométrico 70 cm de distância do observador direcionado para a superfície branca em ambiente

iluminado artificialmente. Para se determinar o grau de turbidez da solução, foi considerada turva a solução, no local em que se encontravam os números da escala sob forte turbidez (perda da nitidez). A leitura do número gravado era realizada de baixo para cima até constatar alta turbidez. (Figura 3)

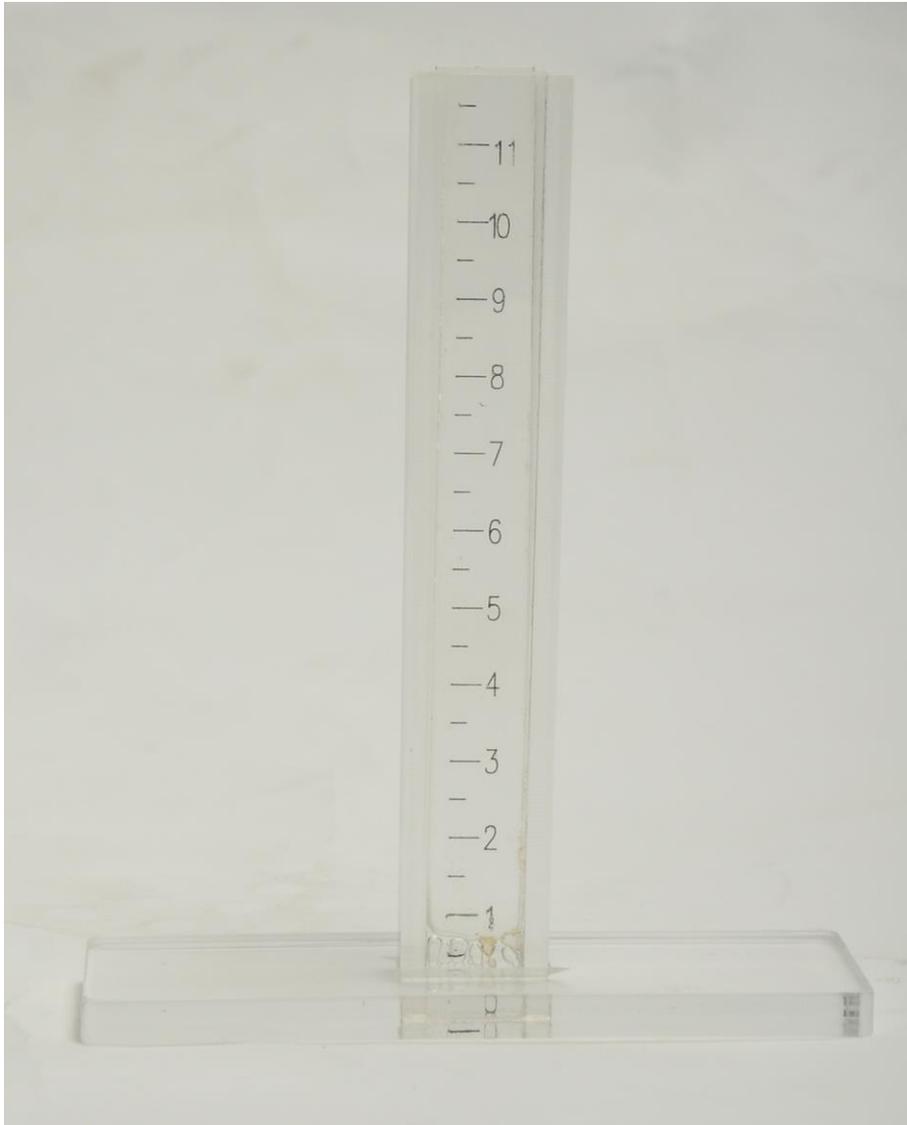


Fig. 2. Espermiodensímetro representado vazio sob luz artificial.



Fig. 3. Espermiodensímetro com solução turvando no número 5 da escala, sob luz artificial.

As leituras da mesma amostra nos espermiodensímetros foram elaboradas por 2 avaliadores em dois momentos diferentes, um desconhecendo o resultado da avaliação do outro; além disso, os avaliadores desconheciam o resultado da leitura da amostra feita no método padrão (câmara de Neubauer), o qual era realizado posteriormente às análises nos espermiodensímetros. Cada valor obtido nas leituras dos espermiodensímetros era registrado em um bloco de notas, totalizando dois valores por espermiodensímetro/amostra.

O procedimento de leituras da concentração na Câmara de Neubauer foi realizado na diluição 1:20, ou seja, 1 parte de sêmen e 19 partes de formol-salina-tamponada, contando-se 5 quadros de cada lado da câmara e estando esses valores em uma margem de 10% máximo de diferença [15].

A partir disso, os números da escala obtidos dos modelos de espermiométrico foram comparados com as contagens feitas na câmara de Neubauer e tabelados de maneira que a numeração da escala dos espermiométricos e valor de concentração contabilizado por meio da câmara de Neubauer fossem relacionados.

2.4. Análise estatística

Com base na determinação da concentração do sêmen na Câmara de Neubauer foram calibrados os dois modelos de espermiométrico. Para cada modelo de espermiométrico foi realizado um ajuste de escala para que se soubesse se a curva de valores criada era representativa e precisa, o que gerou uma função da qual originou-se a tabela de concentrações.

Foi realizada uma regressão linear pelo método de mínimos quadrados com modelo exponencial, conforme segue: $concentração = a \cdot e^{b \cdot escala}$

Onde a “concentração” corresponde à leitura na câmara de Neubauer; a letra “a” representa o ponto onde a curva intercepta o eixo y; a “escala” é a variação de 1 a 10 lida no espermiométrico; “b” determina a sua forma; “e” é a constante de Euler de valor 2,718281. Por premissa, espera-se um valor de “b” negativo, pois a função é decrescente.

A partir da regressão linear, foi gerada uma função para cada espermiométrico, sendo que as tabelas foram confeccionadas utilizando a função para prover um valor de concentração para cada número da escala dos espermiométricos. Foi também estabelecida uma margem de concentrações para cada número da escala, por meio de interpolação, a fim de abranger variações de concentração dentro do intervalo da função.

Foi feita uma média das leituras dos graus de turbidez obtidas por dois avaliadores para cada espermiométrico, com intuito de correlacionar as leituras das escalas com os valores obtidos nas amostras correspondentes na câmara de Neubauer. Foi utilizada correlação de Pearson adotando-se nível de significância de 95%.

O software Statgraphics Centurion XVI (2009) foi utilizado para as análises estatísticas.

3. Resultados e discussão

Os modelos 8 e 10, selecionados para serem usados e calibrados no presente estudo possuem as dimensões apresentadas na figura 4A e 4B respectivamente.

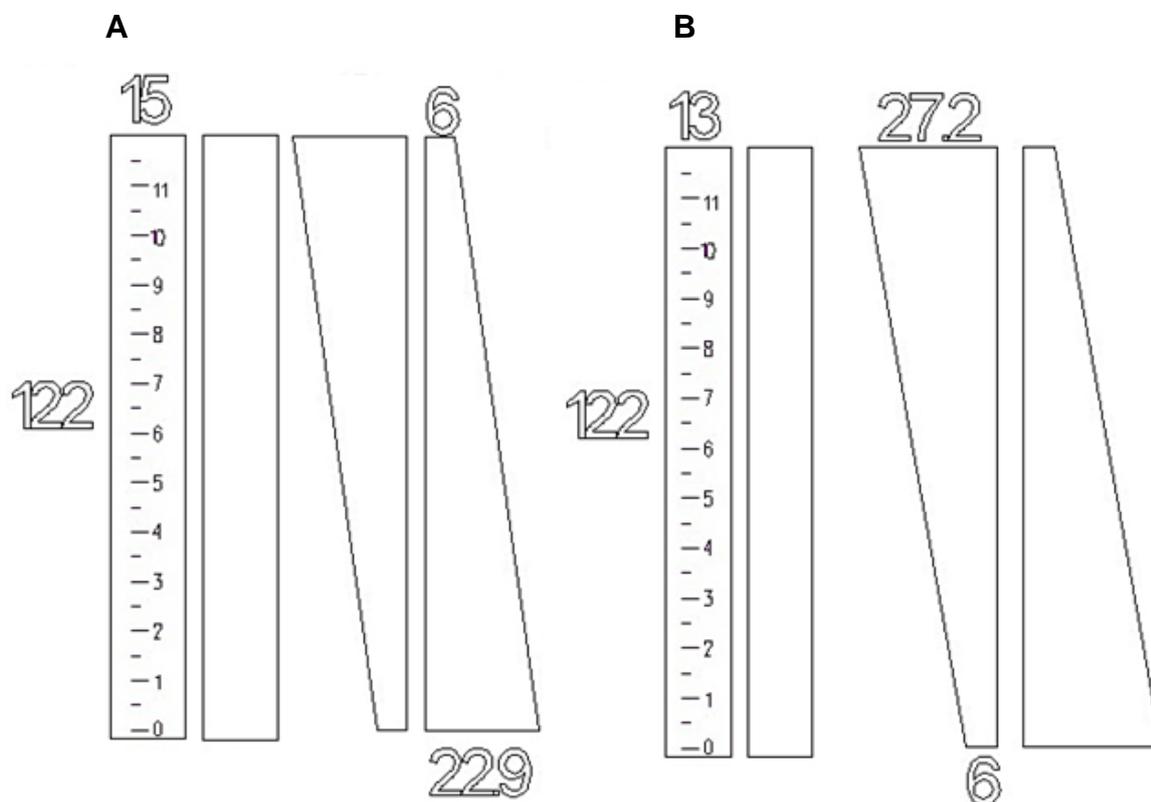


Fig. 4. (A) Peças e dimensões do espermiodensímetro de 8^o expressas em milímetros. (B) Peças e dimensões do espermiodensímetro de 10^o expressas em milímetros.

Nas figuras 5 e 6 observou-se que os ajustes das curvas foram precisos e com valores de R^2 próximos a 1. Para o Modelo 8 R^2 foi igual a 0,9395 e para o Modelo 10 R^2 foi igual a 0,9418.

Ambos os modelos de espermiodensímetro provaram a capacidade de realizar as leituras de forma adequada, visto que o valor de R^2 próximo a 1 é indicativo de precisão no ajuste da função.

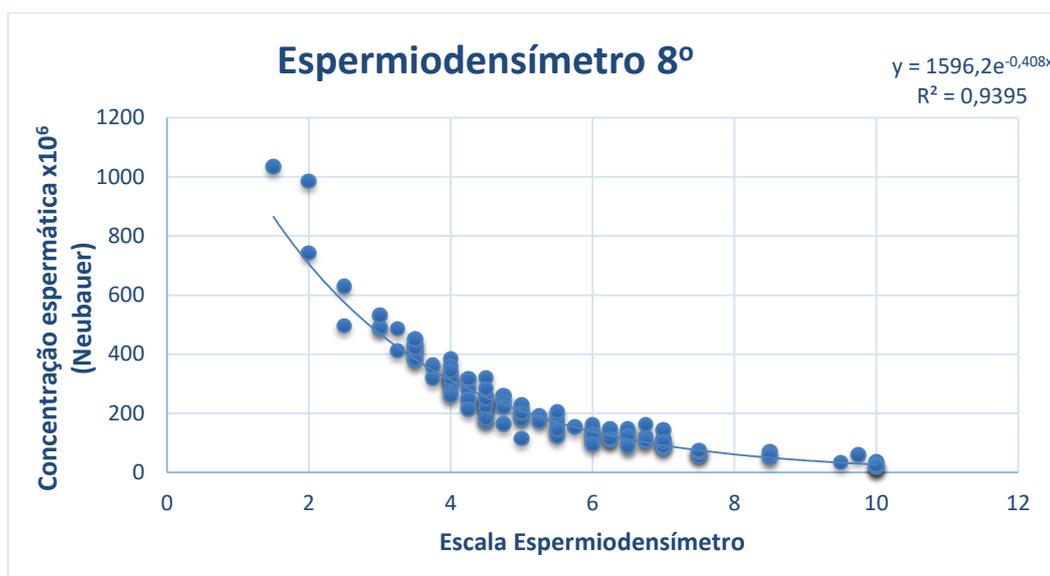


Fig. 5. Regressão linear e dispersão de dados de concentrações para amostras de sêmen equino lidas no espermiodensímetro de 8 graus e na câmara de Neubauer (n=123)

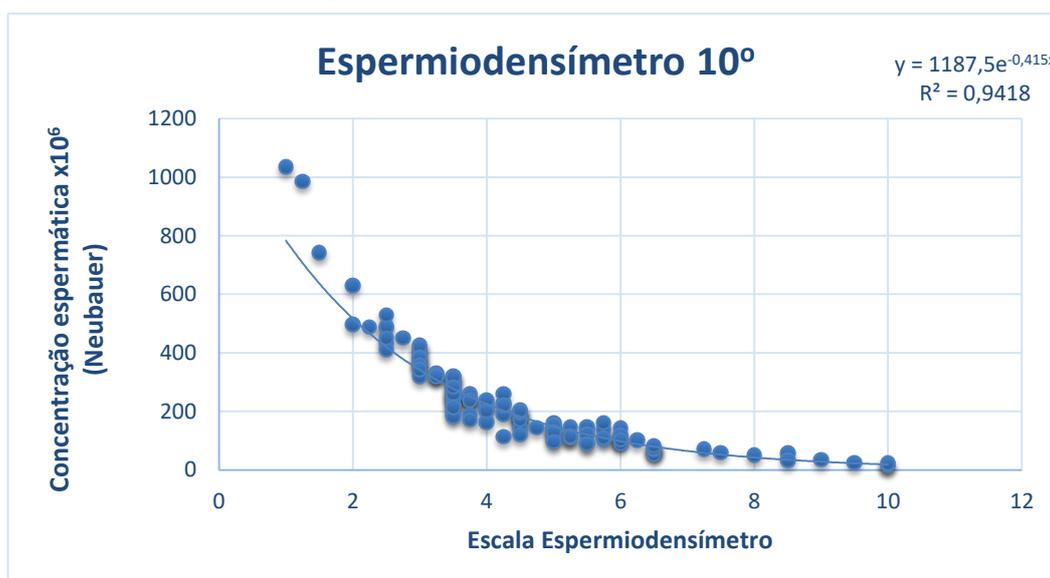


Fig. 6. Regressão linear e dispersão de dados de concentrações para amostras de sêmen equino lidas no espermiodensímetro de 10 graus e na câmara de Neubauer (n= 123)

Com base nas regressões de cada modelo foi feita a interpolação dos dados de maneira que os valores de concentração ficassem restritos em intervalos de máximo e mínimo para cada ponto da escala como demonstrado nas figuras 7 e 8. Por ser um método que não realiza a contagem de maneira exata das células espermáticas adotou-se a variação para cada número da escala com intuito de incluir concentrações que estivessem entre os valores da função, visto que mesmo o método objetivo (câmara de Neubauer) possui uma tolerância de 10% para cada lado e existem relatos de variações até maiores [16, 17]

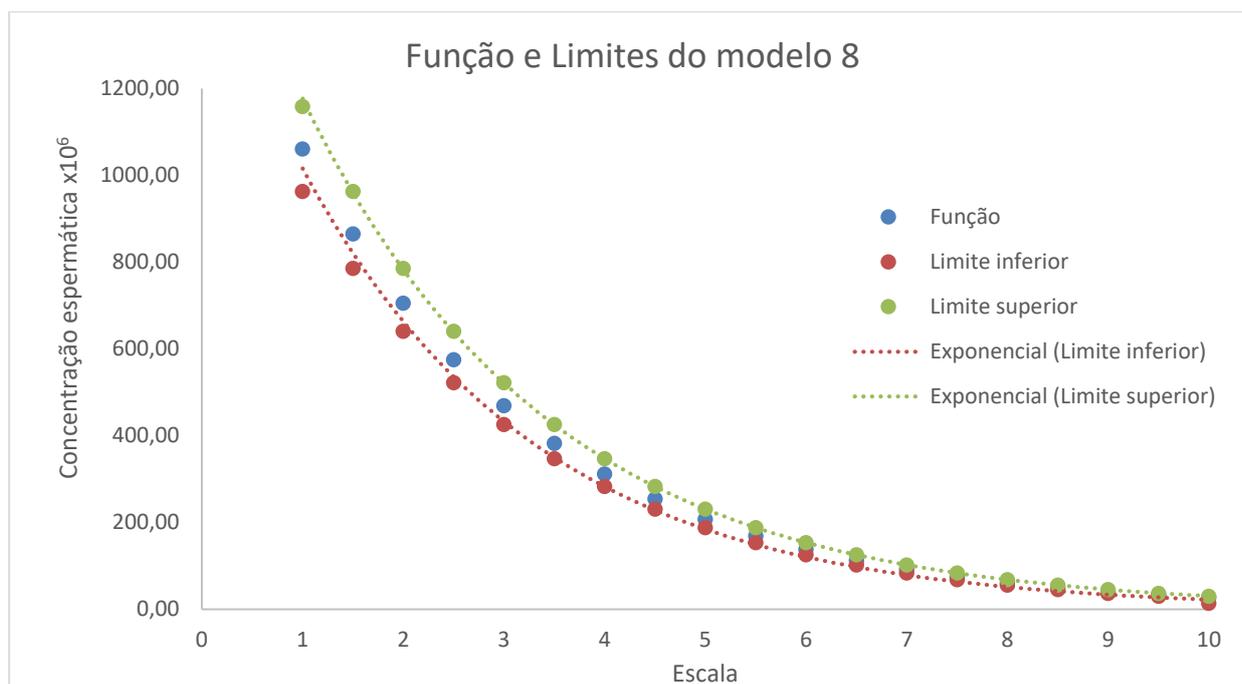


Fig. 7. Limites inferior e superior em relação a regressão linear das concentrações para amostras de sêmen equino lidas no espermiométrico de 8 graus

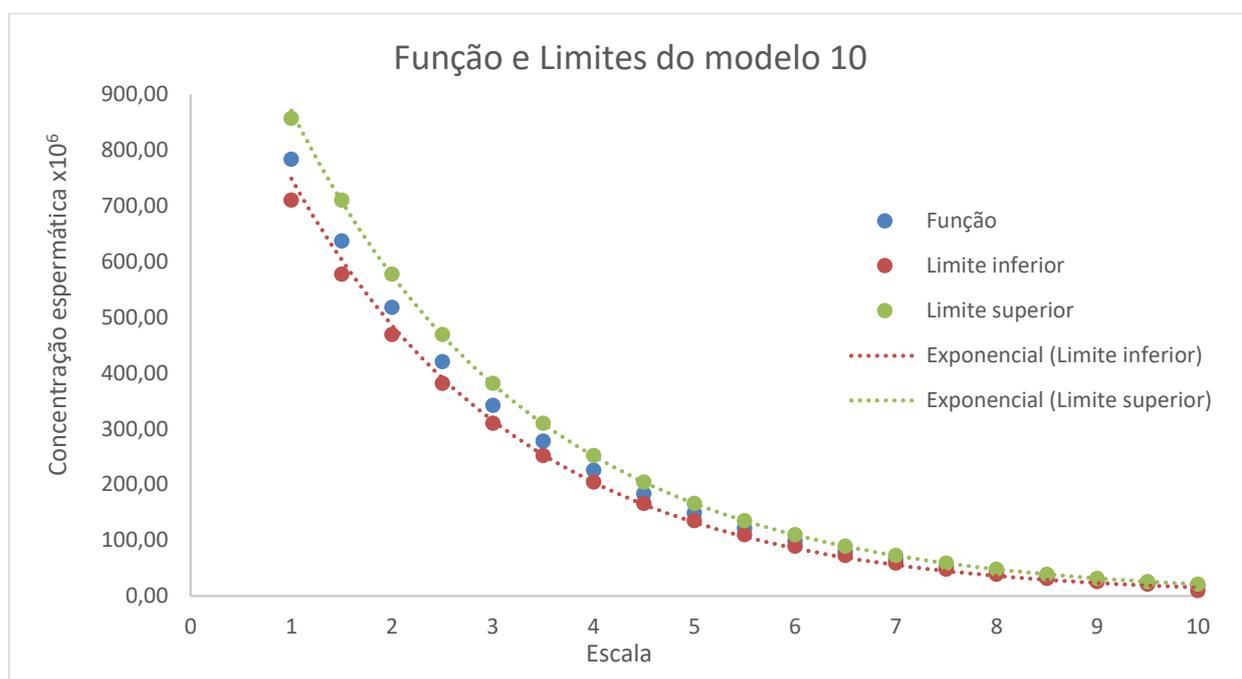


Fig. 8. Limites inferior e superior em relação a regressão linear das concentrações para amostras de sêmen equino lidas no espermiométrico de 10 graus

Nas tabelas 1 e 2 estão discriminados os valores de concentração espermática média ($10^6/\text{mL}$) obtidos ao se proceder a regressão linear, assim como os limites inferior e superior, para cada grau de turbidez em ambos os espermiométricos.

Tabela 1 - Valores da concentração espermática para garanhões com limites inferior e superior no espermiométrico de 8 graus, correspondentes a cada número em escala de 1 a 10 (n=123)

Escala de leitura (1 – 10)	Concentração (10 ⁶ /mL)	Limite inferior (10 ⁶ /mL)	Limite superior (10 ⁶ /mL)
1	1061,31	963,38	1159,23
1,5	865,46	785,60	963,38
2	705,75	640,63	785,60
2,5	575,51	522,41	640,63
3	469,31	426,00	522,41
3,5	382,70	347,39	426,00
4	312,08	283,28	347,39
4,5	254,49	231,01	283,28
5	207,53	188,38	231,01
5,5	169,23	153,61	188,38
6	138,00	125,27	153,61
6,5	112,53	102,15	125,27
7	91,77	83,30	102,15
7,5	74,83	67,93	83,30
8	61,02	55,39	67,93
8,5	49,76	45,17	55,39
9	40,58	36,84	45,17
9,5	33,09	30,04	36,84
10	26,98	13,49	30,04

O valor da escala desta tabela corresponde ao número lido na escala na parte de trás do espermiométrico;

A concentração corresponde ao valor obtido pela regressão linear a ser usado para a leitura da concentração;

Os limites inferior e superior correspondem a interpolação dos valores da concentração para menos e para mais respectivamente de maneira que cada valor da escala possua um intervalo de concentrações específico.

Tabela 2 - Valores da concentração espermática para garanhões com limites inferior e superior no espermiométrico de 10 graus, correspondentes a cada número em escala de 1 a 10 (n=123)

Escala de leitura (1 – 10)	Concentração (10 ⁶ /mL)	Limite inferior (10 ⁶ /mL)	Limite superior (10 ⁶ /mL)
1	783,82	710,38	857,26
1,5	636,95	577,27	710,38
2	517,59	469,10	577,27
2,5	420,60	381,19	469,10
3	341,79	309,76	381,19
3,5	277,74	251,72	309,76
4	225,69	204,55	251,72
4,5	183,40	166,22	204,55
5	149,04	135,07	166,22
5,5	121,11	109,76	135,07
6	98,41	89,19	109,76
6,5	79,97	72,48	89,19
7	64,99	58,90	72,48
7,5	52,81	47,86	58,90
8	42,91	38,89	47,86
8,5	34,87	31,60	38,89
9	28,34	25,68	31,60
9,5	23,03	20,87	25,68
10	18,71	9,36	20,87

O valor da escala desta tabela, corresponde ao número lido na escala na parte de trás do espermiométrico;

A concentração corresponde ao valor obtido pela regressão linear a ser usado para a leitura da concentração;

Os limites inferior e superior correspondem a interpolação dos valores da concentração para menos e para mais respectivamente de maneira que cada valor da escala possua um intervalo de concentrações específico.

Os resultados das análises de correlação entre as leituras feitas nos modelos 8 e 10 foram respectivamente de -0,83 e -0,8, ambos com significância de $P < 0,0001$. Esses valores indicam elevada e significativa correlação negativa, ou seja, quanto maior a concentração menor será o número lido na escala do espermiométrico, e quanto menor for a concentração maior será o número lido na escala do espermiométrico.

A metodologia de leitura da concentração espermática de ejaculado equino mediante o espermiométrico gerou resultado confiável, consistente (calibrado pelos exames paralelos da câmara de Neubauer) e prático para ser executado à campo, tornando-se uma excelente alternativa ao tradicional uso da câmara de Neubauer. Com os espermiométricos desenvolvidos pelo grupo é possível executar a imediata diluição da amostra a ser avaliada, logo após a obtenção do ejaculado, sem a necessidade de câmara de Neubauer e de microscópio. Com a estimativa da concentração realizada é possível determinar a quantidade de diluente a ser adicionada antes do uso do ejaculado, a qual deverá estar de acordo com a concentração e finalidade (refrigeração, inseminação de grande número de éguas) [10].

Reforçando a utilização e a consistência de resultados de avaliações seminais por espermiométricos, o espermiométrico de Karras foi comparado à câmara de Neubauer e espectrofotômetro por Barbosa et al. [11] com sêmen bovino, verificando a não existência de diferença estatística entre o espermiométrico de Karras e câmara de Neubauer, sendo que o espermiométrico foi considerado o melhor dentre os três métodos, tão preciso quanto à câmara de Neubauer, de maior rapidez nas avaliações seminais, além de exigir menor custo que o espectrofotômetro ou até mesmo quando utilizada a câmara de Neubauer, pois para a leitura da câmara necessita-se de microscópio. Apesar de estatisticamente mostrar-se consistente com os valores obtidos na câmara de Neubauer, o valor médio obtido no espermiométrico de Karras foi menor do que o encontrado na Neubauer para sêmen bovino [11], contrariamente ao que foi relatado em suínos, onde o espermiométrico tendeu a superestimar a concentração [9,12]. Por sua vez, o espectrofotômetro gera acentuadas divergências entre os pesquisadores, apresentando relatos de superestimação [12] e subestimação [9] da concentração do sêmen. A superestimação espermática pode levar à produção de doses inseminantes com concentração seminal inferior às normas recomendadas, acarretando falhas na fertilidade [9] comprometendo a eficiência reprodutiva no rebanho.

Deste modo, a hipótese do presente estudo pode ser confirmada, pois foi possível desenvolver um espermiométrico capaz de mensurar a concentração espermática.

4. Conclusão

Os espermiodensímetros (de 8 e 10 graus) possibilitaram a leitura de várias concentrações espermáticas, de modo confiável e consistente com a leitura executada na câmara de Neubauer; os espermiodensímetros equinos desenvolvidos podem ser utilizados com segurança para estimar a concentração do sêmen em condições de campo; em relação à conclusão da tabela para as concentrações, melhorias futuras poderão eventualmente ser executadas na fórmula, visando aprofundar a precisão dos dados.

Observação: Os modelos desenvolvidos no presente estudo, foram protegidos pelo depósito de Patente de Invenção junto ao INPI/BR em 17 de agosto de 2016, com a numeração: BR 10 2016 019032 0, seguindo-se os trâmites nacionais.

5. Referências

- [1] Antunez L, Hartwig FP, Santos RS, Bianchi I, Curcio BR. Relação entre taxa de prenhez por ciclo, motilidade e testes de fluorescência espermática em equinos da raça Crioula. In: Congresso de iniciação científica, 19., encontro de pós-graduação, 12., e mostra científica, 2.; 9-12 de novembro 2010; Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.
- [2] Noakes DE, Arthur GH, Parkinson TJ, England GCW. Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. 8th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2001.
- [3] Santos BES. Estudo explanatório do mercado e da produção do Cavalo Brasileiro de Hipismo no Estado de São Paulo. Pirassununga. Dissertação [Mestrado em Gestão na Indústria Animal] – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo; 2016
- [4] Oliveira FJG. Efeito da adição de glicerol em diferentes etapas do resfriamento sobre a congelabilidade do sêmen de garanhões (Dissertação de Mestrado). Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2007.
- [5] Vivacqua M. Transferência de embriões em éguas-novas estratégias. In: Semana Capixaba do Médico Veterinário, 35., e Encontro Regional de Saúde Pública em Medicina Veterinária, 3.; setembro de 2008. Guarapari, Espírito Santo, Brasil.

- [6] Nunes DB, Zúccari CSRN, Costa EV, Silva EV. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. *Rev Bras Reprod Anim.* 2006; 30: 42-56.
- [7] Guasti PN, Monteiro GA, Papa FO. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade espermática de equinos. *Veterinária e Zootecnia.* 2012; 19: 169-180.
- [8] Griffin PG. The breeding soundness examination in the stallion. *J Equine Vet Sci* 2000;20:168-71
- [9] Vianna WL, Bruno DG, Namindome A, Rosseto AC, Rodrigues PHM, Pinese ME, Moretti AS. Estudo comparativo da eficiência de diferentes técnicas de mensuração da concentração espermática em suínos. *Rev Bras Zootec.* 2004; 33: 2054-2059.
- [10] Conboy HS. Management of stallions in artificial insemination. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. *Equine reproduction.* 2ª Ed. Blackwell: Iowa. 2011,p. 1198-1207
- [11] Barbosa CP, Oliveira WC e Ribeiro Júnior WR. Comparação entre as principais técnicas de análise da concentração espermática em exames andrológicos de touros a campo. *PUBVET.* 2011;5: art.1100.
- [12] Murgas LDS, Lima D, Alvarenga ALN, Zangeronimo MG, Oberlender G, Oliveira SL. Estudo comparativo de diferentes técnicas de avaliação da concentração espermática em suínos. *Archivos de Zootecnia.* v. 59, n. 227, p. 463-466. 2010.
- [13] Garner DL, Hafez ESE. Espermatozóides e Plasma Seminal. In: Hafez ESE, Hafez B. *Reprodução Animal.* 7ª Edição. Barueri: Manole. 2004. p. 97-110
- [14] Love CC. Reproductive examination of the stallion: evaluation of potential breeding soundness. In: Youngquist RS, Tharelfall WR. *Current therapy in large animal. Theriogenology.* 2nd. ed. Saint Louis: Elsevier-Saunders, 2007. p. 10-14.
- [15] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2 Ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- [16] Brazil C, Swan SH, Tollner CR, Treece C, Drobnis EZ, Wang C, et al. Quality control of laboratory methods for sêmen evaluation in a multicenter research study. *J Androl* 2004;25:645-56.
- [17] Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E. External quality control in the andrology laboratory: An experimental multicenter trial. *Fertil Steril* 1990; 54(2): 308-14.

CAPITULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método padrão de mensuração de concentração (câmara de Neubauer) exige contagem manual dos espermatozoides, o que pode ser demorado, e está sujeito às variações decorrentes de erros humanos. Assim, com o presente trabalho é possível concluir que os modelos de espermiométrico desenvolvidos são capazes de estimar a concentração espermática de gametas de forma rápida, prática e de baixo custo, sendo uma alternativa ao método padrão para condições à campo.

Em estudos futuros, a eficiência do método pode ser comparada a outras formas de mensuração espermática.

REFERÊNCIAS

- [1] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Prod. Pec. munic., Rio de Janeiro. 2014; 42:1-39.
- [2] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo. Brasília. 2016; 1-56.
- [3] Antunez L, Hartwig FP, Santos RS, Bianchi I, Curcio BR. Relação entre taxa de prenhez por ciclo, motilidade e testes de fluorescência espermática em equinos da raça Crioula. In: Congresso de iniciação científica, 19., encontro de pós-graduação, 12., e mostra científica, 2.; 9-12 de novembro 2010; Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.
- [4] Noakes DE, Arthur GH, Parkinson TJ, England GCW. Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. 8th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2001.
- [5] Santos BES. Estudo explanatório do mercado e da produção do Cavalo Brasileiro de Hipismo no Estado de São Paulo. Pirassununga. Dissertação [Mestrado em Gestão na Indústria Animal] – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo; 2016
- [6] Oliveira FJG. Efeito da adição de glicerol em diferentes etapas do resfriamento sobre a congelabilidade do sêmen de garanhões (Dissertação de Mestrado). Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2007.
- [7] Vivacqua M. Transferência de embriões em éguas-novas estratégias. In: Semana Capixaba do Médico Veterinário, 35., e Encontro Regional de Saúde Pública em Medicina Veterinária, 3.; setembro de 2008. Guarapari, Espírito Santo, Brasil.
- [8] Nunes DB, Zúccari CSRN, Costa EV, Silva EV. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. Rev Bras Reprod Anim. 2006; 30: 42-56.
- [9] Guasti PN, Monteiro GA, Papa FO. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade espermática de equinos. Veterinária e Zootecnia. 2012; 19: 169-180.
- [10] Griffin PG. The breeding soundness examination in the stallion. J Equine Vet Sci 2000;20:168-71

- [11] Arruda RP, Andrade AFC, Peres KR, Raphael CF, Nascimento J, Celeghini ECC. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. *Rev Bras Reprod Anim.* 2007; 31: 8-16.
- [12] Conboy HS. Management of stallions in artificial insemination. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. *Equine reproduction.* 2ª Ed. Blackwell: Iowa. 2011,p. 1198-1207
- [13] Vianna WL, Bruno DG, Namindome A, Rosseto AC, Rodrigues PHM, Pinese ME, Moretti AS. Estudo comparativo da eficiência de diferentes técnicas de mensuração da concentração espermática em suínos. *Rev Bras Zootec.* 2004; 33: 2054-2059.
- [14] Garner DL, Hafez ESE. Espermatozóides e Plasma Seminal. In: Hafez ESE, Hafez B. *Reprodução Animal.* 7ª Edição. Barueri: Manole. 2004. p. 97-110
- [15] Brazil C, Swan SH, Tollner CR, Treece C, Drobnis EZ, Wang C, et al. Quality control of laboratory methods for sêmen evaluation in a multicenter research study. *J Androl* 2004;25:645-56.
- [16] Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E. External quality control in the andrology laboratory: An experimental multicenter trial. *Fertil Steril* 1990; 54(2): 308-14.
- [17] Zinaman MJ, Uhler ML, Vertuno E, Fisher SG, Clegg ED. Evaluation of computer-assisted semen analysis (CASA) with IDENT stain to determine sperm concentration. *J Androl* 1996; 17(3): 288-92.
- [18] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2 Ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- [19] Arruda RP. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA) (Tese de Livre Docência). São Paulo, SP: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2000.
- [20] Celeghini ECC. Efeitos da criopresevação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acromossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes (Tese de Doutorado em Medicina Veterinária). São Paulo, SP: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2005.
- [21] Aman RP, Katz D. Reflections on CASA after 25 years. *J Androl* 2004; 25(3): 317- 25.

- [22] Verstegen J, Iguer-Ouada M, Oclin K. Computer assisted semen analysis in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 2002; 57: 149-79.
- [23] Iguer-Ouada M, Verstegen JP. Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology* 2001;55:733-49.
- [24] Davis RO, Katz DF. Operational Standards for CASA Instruments. *J Androl* 1993; 14: 385-95.
- [25] Barbosa CP, Oliveira WC e Ribeiro Júnior WR. Comparação entre as principais técnicas de análise da concentração espermática em exames andrológicos de touros a campo. *PUBVET*. 2011;5: art.1100.
- [26] Murgas LDS, Lima D, Alvarenga ALN, Zangeronimo MG, Oberlender G, Oliveira SL. Estudo comparativo de diferentes técnicas de avaliação da concentração espermática em suínos. *Archivos de Zootecnia*. v. 59, n. 227, p. 463-466. 2010.