

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

GIOVANNA POLO

**ANÁLISE ESPERMÁTICA ASSISTIDA POR COMPUTADOR (CASA) DE SÊMEN
EQUINO: USO DO IMAGEJ COM CÂMERA DE CELULAR E MICROSCÓPIO
ÓPTICO**

(Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) of stallion semen: use of ImageJ with
cell phone camera and light microscope)

CURITIBA

2016

GIOVANNA POLO

**ANÁLISE ESPERMÁTICA ASSISTIDA POR COMPUTADOR (CASA) DE SÊMEN
EQUINO: USO DO IMAGEJ COM CÂMERA DE CELULAR E MICROSCÓPIO
ÓPTICO**

(Computer assisted sperm analysis (CASA) of stallion semen: use of ImageJ with
cell phone camera and light microscope)

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(a): Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki

CURITIBA

2016

TERMO DE APROVAÇÃO
(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)

(Entregue pela secretaria)

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA.....	vi
AGRADECIMENTOS.....	vii
FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....	viii
RESUMO GERAL.....	ix
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO.....	1
1.1.CONTEXTUALIZAÇÃO.....	1
1.2.ANÁLISE DE MOTILIDADE ESPERMÁTICA.....	2
1.3. ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA.....	3
1.4. COMPUTER ASSISTED SPERM ANALISYS (CASA).....	5
1.4.1. SURGIMENTO E VALIDAÇÃO.....	5
1.4.2.CAPACIDADES.....	6
1.4.3.LIMITAÇÕES.....	7
1.4.4.PERSPECTIVAS.....	9
1.5. OBJETIVOS DO TRABALHO.....	10
CAPÍTULO 2.....	11
ARTIGO (AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA DE GARANHÕES PELO IMAGEJ, ASSOCIADO À CÂMERA DE TELEFONE CELULAR E MICROSCÓPIO ÓPTICO).....	11
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
2.1. MICROSCÓPIO E CÂMERA.....	14
2.2. ANIMAIS E COLETA DE AMOSTRAS.....	15

2.3. AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA.....	16
2.4. CONFIGURAÇÕES DO CASAF.....	16
2.4.1. PROCESSAMENTO PRÉVIO.....	16
2.4.2. CONFIGURAÇÕES DO PLUGIN CASA.....	18
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4. CONCLUSÃO.....	25
5. REFERÊNCIAS.....	25
CAPÍTULO 3.....	28
ARTIGO (USO DO IMAGEJ, CÂMERA DE SMARTPHONE E MICROSCÓPIO ÓPTICO PARA AVALIAR A CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA DE GARRANHÕES).....	28
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
2.1. MICROSCÓPIO E CÂMERA.....	32
2.2. ANIMAIS E COLETA DE AMOSTRAS.....	32
2.3. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA.....	33
2.4. CONFIGURAÇÕES DO IMAGEJ.....	33
2.4.1. PROCESSAMENTO DAS IMAGENS.....	33
2.4.2. CONTAGEM ESPERMÁTICA NO IMAGEJ.....	35
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4. CONCLUSÃO.....	42
5. REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO 4	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS.....	46
ANEXO.....	50

Dedico à Deus e à minha família e amigos, em especial minha mãe Neusa e Luis, pelo apoio, amor e companheirismo nesta etapa.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar presente em minha vida me dando forças para continuar a seguir meus sonhos.

À minha família, especialmente minha mãe Neusa, pelo apoio e incentivo incondicional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki, por acreditar no projeto e me apoiar em todas as etapas.

Ao meu namorado Luis Freitag, pelo companheirismo, paciência, apoio e ajuda em todas as etapas do projeto.

À USP, professor Marcílio Nichi e ao doutorando João Diego de Agostini Losano, pela disponibilização e auxílio com o sistema CASA, parte fundamental do projeto.

Aos Professores Marco Flávio Mattana, Jacques Facon, Alceu de Souza Britto Junior, Edson José Rodrigues Justino, Paulo Renato Parreira e Luis Fernando Fonseca Kasprzak pelo auxílio em diferentes etapas, cruciais para a realização do projeto.

À colega de profissão e amiga Sara, pela indicação de proprietários interessados em contribuir no projeto.

Aos proprietários, por colaborar com o projeto permitindo que seus animais participassem do estudo.

Aos meus amigos Mayra, Elizabeth, Kassy, Ionara e Vinícius, minha gratidão pela amizade e apoio recebido de vocês.

À PUCPR pela isenção concedida.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos formatados de acordo com o periódico *Theriogenology* (A2).

O capítulo 1 apresenta a contextualização, introdução geral, bem como os objetivos de estudo.

Os capítulos 2 e 3 tratam de artigos completos escritos na formatação da revista pretendida para publicação.

O capítulo 4 finaliza esta dissertação com conclusões gerais e sugestões para estudos futuros.

Ao final do capítulo 4 estão as referências usadas no capítulo 1.

RESUMO GERAL

O objetivo do presente estudo foi o de testar o uso do programa de código aberto ImageJ (processador de imagens em plataforma Java) à campo, usando microscópio óptico e câmera de celular para avaliar a motilidade total e a concentração de sêmen equino. Para isso foi necessário utilizar um adaptador universal para smartphones e melhorar a qualidade das imagens e vídeos por meio de corte, remoção de fundo e uso da ferramenta "threshold" do ImageJ. Para a determinação da motilidade, foram utilizadas 70 amostras de sêmen equino, incluindo amostras refrigeradas (48) e congeladas (22) que tiveram seus valores de motilidade total comparados entre avaliação visual e plugin CASA do ImageJ (CASAF). As amostras congeladas (22), além de serem avaliadas por meio de análise visual e CASAF, foram avaliadas por um CASA comercial (CCASA). Os cálculos das comparações foram feitas com ANOVA, teste de correlação de Pearson e de Qui-quadrado, visando a detecção de erros do CASAF e análise visual em relação ao CCASA (considerando-se uma margem de 10,0%). A ANOVA não resultou em diferença estatística ($P > 0,05$) para as 70 amostras comparadas entre CASAF ($37,9 \pm 25,8$) e entre os dois avaliadores experientes ($37,6 \pm 25,0$ e $37,5 \pm 25,5$). A comparação das 22 amostras congeladas entre o CASAF ($23,36 \pm 15,9$), análise visual ($25,5 \pm 18,8$ e $25,8 \pm 18,5$) e CCASA ($25,2 \pm 18,3$) também não resultou em diferença estatística. A média dos resultados obtidos com o CASAF subestimou a média obtida em relação ao CCASA em 7,2%. A correlação entre CASAF e o CCASA foi significativamente elevada ($r = 0,95$, $P < 0,0001$), bem como a correlação entre CASAF e análise visual ($r = 0,92$, $P < 0,0001$). Os testes de Qui-quadrado resultaram em proporção de acertos similares entre o CASAF e o CCASA ($P = 0,14$), ao passo que a análise visual, resultou em proporções diferentes em comparação ao CCASA ($P = 0,04$). Mesmo que haja uma diferença de algoritmo entre diferentes sistemas CASA, com o uso do CASAF à campo foi possível obter-se um valor de motilidade total muito próximo ao verificado em programas comerciais, tendo maior acurácia do que as análises visuais. Com referência à concentração do sêmen equino foram utilizadas 108 amostras à fresco, analisadas no hemocitômetro (câmara de Neubauer) e no programa de código aberto ImageJ (ImageJ), por meio de fotos da mesma câmara após a contagem. Dezenove dessas amostras foram também analisadas em um CCASA e comparadas aos demais métodos. As comparações foram feitas pelo teste de Friedman, de Dunn, teste t pareado, correlação de Pearson e Qui-quadrado (total e entre classes de concentração: < 100 , $100-200$, $200-300$ e $> 300 \times 10^6/\text{mL}$), considerando-se como acertos, valores em uma margem de 10% do valor da Neubauer (padrão). Houve diferença nas médias de concentração do sêmen entre o CCASA ($381,1 \pm 212,2$) e Neubauer ($239,4 \pm 180,3$) demonstrada por teste de Dunn e teste t pareado, porém não houve diferença (Dunn) entre ImageJ ($210,2 \pm 147$) e Neubauer ($206,1 \pm 143,7$). Considerando a diferença média entre os métodos, o ImageJ superestimou a concentração obtida com a Neubauer em 1,9%, enquanto que o CCASA superestimou em 59,2%. A correlação entre ImageJ e Neubauer foi fortemente positiva ($r = 0,99$; $P < 0,0001$). A proporção de acertos, tanto de ImageJ como de CCASA, foi diferente ($P < 0,0001$) em comparação à Neubauer. Ainda assim, ImageJ obteve 73% de acertos, e o CCASA somente 5,3%. Erros individuais do ImageJ comparado à Neubauer por classes foram significativos somente nos dois grupos com menores concentrações, sendo consistente com relatos de imprecisão dos métodos computadorizados para amostras com menor concentração celular. Já o CCASA obteve erros de

superestimação significativos em todas as classes. Considerando a variação de contagem universalmente aceita da própria câmara de Neubauer, a diferença entre esse método e o ImageJ foi aceitável. Conclui-se que é possível analisar a motilidade total e a concentração de sêmen equino utilizando um microscópio óptico e uma câmera de celular, resultando em valores consistentes aos obtidos por métodos consagrados com baixo custo de equipamento.

Palavras-chave: CASA. Motilidade. Concentração. ImageJ. Garanhão. Smartphone.

ABSTRACT

The objective of this study was to test the use of the open source software ImageJ (image processor on Java platform) under field conditions, with light microscope and cell phone camera to evaluate total percent motility and concentration of equine semen. A smartphone adapter was attached to the eyepiece of the microscope, and images and videos needed previous enhancement, such as “crop”, background subtraction and “threshold” (ImageJ tools) to improve quality, which is indispensable for correct semen analysis. In the experiment of motility, 70 samples of equine semen, frozen (22) and cooled (48), had their total motility values compared between visual evaluation and ImageJ plugin (CASAF). The frozen samples (22), besides being evaluated by visual analysis and CASAF, were also evaluated by a commercial CASA (CCASA). Comparisons were made using ANOVA, Pearson’s correlation and Chi-square test to compare errors of CASAF and visual analysis compared to CCASA, using a margin of 10%. ANOVA did not result in statistical difference ($P > 0.05$) between 70 samples analyzed with CASAF ($37,9 \pm 25,8$) and by two experienced technicians ($37,6 \pm 25,0$ and $37,5 \pm 25,5$). The comparison of the 22 frozen samples between CASAF ($23,36 \pm 15,9$), visual analysis ($25,5 \pm 18,8$ e $25,8 \pm 18,5$) and CCASA ($25,2 \pm 18,3$) did not result in statistical difference either. The average of results obtained with CASAF underestimated the average obtained with CCASA in 7,2%. The correlation between CASAF and CCASA was significantly high ($r=0,95$, $P < 0.0001$), as well as the correlation between CASAF and visual analysis ($r=0,92$, $P < 0.0001$). Chi-square analysis resulted in similar proportion of correct answers obtained with CASAF when compared to CCASA ($P=0,14$), while visual analysis had different proportion compared to CCASA ($P=0,04$). Even if there is a difference in algorithm of different CASA systems, it was possible to obtain values of total motility similar to the ones found in commercial programs using field conditions, being more accurate than visual analysis. In the experiment of sperm concentration 108 samples of fresh equine semen were analyzed with hemocytometer (Neubauer) and ImageJ (ImageJ), using photos of the same chamber, after perform counting. Nineteen of these samples were also analyzed in a CCASA and compared to the other methods. Comparisons were made using Friedman test, Dunn's test, paired t test, Pearson’s correlation and Chi-square (total and within classes of concentration: <100 , $100-200$, $200-300$ and $>300 \times 10^6/\text{mL}$), considering as correct, values within a margin of 10% of those obtained with Neubauer (standard). There was significant difference between CCASA ($381,1 \pm 212,2$) and Neubauer ($239,4 \pm 180,3$) averages, shown by Dunn’s and paired t test, but no difference (Dunn’s) between ImageJ ($210,2 \pm 147$) and Neubauer ($206,1 \pm 143,7$) averages was found. Considering average difference between methods, ImageJ overestimated concentration obtained with Neubauer in 1,9%, while CCASA overestimated in 59,2%. The correlation between ImageJ and Neubauer was highly positive ($r=0,99$, $P < 0,0001$). Proportion of correct answers obtained with either ImageJ or CCASA was different ($P < 0,0001$) from Neubauer. Still, ImageJ achieved 73% of correct answers and CCASA only 5,3%. Errors of ImageJ compared to Neubauer within classes were significant only in the two groups with lower concentration, corroborating reports of imprecision of computerized methods in low concentrated samples. CCASA obtained significant overestimation errors in all classes. Since there is a variation universally accepted in Neubauer chamber itself, the difference between this method and the ImageJ was acceptable. We conclude that it is possible to analyze total motility and concentration of equine semen with ImageJ using a light microscope

and a cell phone camera, resulting in values close to those obtained by reliable methods with a low cost equipment.

Keywords: CASA. Motility. Concentration. ImageJ. Stallion. Smartphone.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. Contextualização

O efetivo de equinos no Brasil, de 5,45 milhões de cabeças em 2014[1], possui grande importância econômica, movimentando 16 bilhões de reais em 2015 e gerando empregos diretos e indiretos. Entre as diversas atividades desempenhadas por cavalos, destacam-se as de esportes, lazer e trabalho [2].

No desenvolvimento da espécie equina, a performance foi muito valorizada, sendo o principal motivo para a escolha dos animais que estariam aptos à ter sua genética difundida. Assim, a escolha dos reprodutores era feita com base no seu desempenho morfológico ou esportivo, em detrimento às suas qualidades reprodutivas, o que explica os baixos índices de fertilidade da espécie comparada às demais [3,4].

Com o crescimento das biotecnologias aplicadas à reprodução animal, houve a necessidade de determinar parâmetros reprodutivos para a melhoria da eficiência reprodutiva [5,6].

Entre as biotecnologias utilizadas em equinos, a inseminação artificial (IA) é a mais difundida, também devido à sua praticidade. Seu uso permite a produção de várias doses inseminantes com o mesmo ejaculado e a distribuição dessas doses para outras regiões, por meio do uso de sêmen refrigerado ou congelado. Assim, a IA é responsável por difundir aceleradamente o material genético masculino, reafirmando que a predição da fertilidade do garanhão se tornou fundamental [6,7].

A fertilidade do reprodutor pode ser avaliada por meio de análises *in vivo*, com taxa de prenhez (TP) de éguas saudáveis; porém esse é um método demorado, não controlável, pois depende de fatores não espermáticos e, muitas vezes, inviável. Portanto, o exame andrológico visa prever o potencial de fertilidade antes do uso do sêmen, em condições ambientais diferentes das naturais [6,8].

A fertilidade deve ser avaliada por meio de exame andrológico completo, incluindo-se a análise espermática. Dentre os parâmetros avaliados rotineiramente na análise espermática estão: aparência, motilidade, concentração, volume, morfologia e pH. No contexto da avaliação básica, a motilidade é fundamental e considerada uma das mais importantes, pois é capaz de prever a viabilidade ou não do sêmen [5].

Os parâmetros de análise espermática, porém, devem ser utilizados de forma conjunta, pois somente um parâmetro não reflete o potencial reprodutivo de um reprodutor [9, 10], além de possíveis mecanismos compensatórios entre os parâmetros. Battut et al. [11] observaram que em alguns animais com motilidade inferior pode ocorrer maior atividade mitocondrial e o efeito sobre a fertilidade pode chegar a ser equivalente à um animal com maior motilidade.

Kenney et al. [12] concluíram que a concentração, motilidade e percentual de espermatozoides morfologicamente normais eram os fatores que mais influenciavam nas TPs. Fernandes e Pimentel [13] também verificaram que os limites mínimos para um ejaculado de boa qualidade incluíam motilidade de 50%, morfologia normal de 60% e $1,8 \times 10^9$ de espermatozoides viáveis.

1.2. Análise de motilidade espermática

A motilidade pode ser avaliada por meio de estimativa subjetiva, observando a amostra entre lâmina e lamínula em microscópio óptico. É possível estimar a porcentagem de espermatozoides móveis, progressivamente móveis e a velocidade, ou intensidade do movimento em uma escala de 1 a 4. Para isso é necessário que o profissional seja capacitado e experiente nesse tipo de análise [8,9]. Ainda assim, há grande variação entre observadores e observações, devido ao erro humano e à natureza subjetiva do teste, sendo que a variação pode atingir 30% ou 60% [14-16].

Outras formas de análise de motilidade, que visam minimizar o erro inerente à subjetividade da análise visual, são os programas de análise computadorizada (Computer-assisted Sperm Analysis - CASA) [5], pois realizam análise objetiva das amostras por meio de identificação e rastreamento das células espermáticas. Logo, fornecem importantes informações e maiores

detalhes além de motilidade total e progressiva, tornando-se fundamentais para pesquisas, clínicas, treinamento de pessoas e estabelecimento de padrões [17,18].

A motilidade progressiva avaliada visualmente obteve a maior correlação com a fertilidade do garanhão em um estudo em 1992 [19]. Porém, o parâmetro que mais teve relação com a fertilidade do garanhão foi o percentual de motilidade total e o percentual de espermatozoides morfolologicamente normais avaliados pelo CASA em 2011 [20]. Em estudo comparativo de análises visuais e computadorizadas para sêmen de garanhões, a análise visual de motilidade total foi considerada mais confiável do que a motilidade progressiva analisada visualmente, devido a sua semelhança com o obtido pelos sistemas computadorizados, uma vez que as análises utilizando tecnologias avançadas são mais criteriosas para parâmetros de movimento celular [21].

Se o objetivo do estudo é verificar precisamente diferenças de movimento de cada espermatozoide, um método mais sofisticado e objetivo como o CASA faz-se necessário [22].

Devido ao grande número de células espermáticas envolvidas, a identificação e o rastreamento automático por meio de visão computadorizada tem sido muito valorizada [23]. Diversos estudos [11,20,24-28] vem utilizando o CASA para comparar motilidade entre raças ou após o uso de diferentes diluentes ou tratamentos.

1.3. Análise de concentração espermática

A concentração é fundamental para se calcular o número de doses e quantidade necessária de diluente para transporte de um ejaculado, especialmente quando a intenção é inseminar grande número de éguas. É a partir da concentração que se calcula a quantidade total de espermatozoides no ejaculado, multiplicando o valor da concentração pelo volume, e é também a partir dela que se calcula a quantidade de espermatozoides viáveis, levando-se em conta a motilidade [5,9,29].

A concentração pode ser obtida de diversas maneiras [5]. O hemocítômetro ou câmara de contagem, apesar de ser demorado é considerado preciso e confiável [7,8]. Existem formas mais rápidas, como espectrofotômetros ou densímetros, que medem a quantidade de luz que atravessa a amostra, porém são menos precisos e são calibrados com o uso de uma câmara de contagem [9]. Todas as técnicas possuem limitações. Erros de pipetagem, diluição e preenchimento da câmara podem ocorrer quando se utiliza tanto o hemocítômetro como o análises computadorizadas [18,30].

Em teste de controle de qualidade, Neuwinger et al. [16] verificaram média de 37,5% de variação na concentração do sêmen humano entre laboratórios para a mesma amostra contada com hemocítômetro, sendo que as variações foram maiores (73%) em amostras de baixa concentração e menores (23%) em amostras com concentração mais elevada. Em outro estudo, foi observado variação de 15,2% entre técnicos, 12,5% para um mesmo técnico e 16,6% em relação a um valor estabelecido pela Central de Andrologia com o uso de câmara de Neubauer [22]. Ainda assim, o hemocítômetro é considerado como método padrão pela World Health Organization [31] e pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [32].

O CASA tem a vantagem da identificação objetiva das células. Porém, células com tamanho e forma similar ao espermatozoide podem resultar em superestimação, o que é um problema para amostras pouco concentradas [30,33]. A média de superestimação chegou a 70% em sêmen canino [34]. Foi observado também que em amostras com concentração elevada alguns espermatozoides não eram contados. Isso resultou em superestimação ou subestimação da concentração, dependendo da amostra, com um erro de $12,1 \pm 42,2\%$ do CASA em relação à câmara de Neubauer, utilizado como método padrão em estudo com sêmen humano [30].

A acurácia da avaliação de concentração utilizando o CASA tem sido um limitante em diversas espécies, incluindo cães, humanos e hamsters [33,34], sendo frequentemente observada a superestimação. Ao utilizar espermatozoides caninos estáticos para realizar as contagens, na mesma câmara, foi percebido maior acurácia, atribuído o erro da contagem computadorizada às colisões de espermatozoides em movimento [34].

Verstegen et al. [33] sugerem que as amostras avaliadas pelo CASA sejam conferidas manualmente em câmara de contagem para o parâmetro de concentração, ou que a contagem seja feita com os espermatozoides parados após diluição com 9% NaCl. Sugerem ainda, que a amostra seja ajustada a uma concentração adequada para mensurar a motilidade (geralmente entre 50 e 300 milhões/mL), já que a concentração influencia as leituras de motilidade no CASA.

1.4. Computer assisted sperm analysis (CASA)

1.4.1. Surgimento e validação

O desenvolvimento do CASA ocorreu nos anos 70, devido à uma convergência de tecnologia e prioridades de governo. O investimento no rastreamento de foguetes e outros objetos macroscópicos aumentou e, como resultado, começaram a surgir técnicas computadorizadas de digitalização, reconhecimento e quantificação de imagens e vídeos. As aplicações dessas tecnologias a um microscópio surgiram e assim o CASA primitivo foi criado [10]. O sistema, porém, só foi introduzido nos laboratórios de pesquisa e medicina em 1986 [35].

O objetivo inicial de uso do CASA era estabelecer padrões úteis para treinamento de indivíduos que faziam leituras subjetivas em instalações comerciais, bem como gerar dados objetivos para aperfeiçoar pesquisas sobre a função espermática [10].

O sistema criado em 1980 [17] consistia em microscópio de contraste de fase, câmera de vídeo, computador, software e câmara de contagem onde era colocada a amostra. O CASA se refere à um sistema automatizado incluindo hardware e software, que visualiza, digitaliza e avalia imagens consecutivas de células espermáticas, gerando informações precisas e objetivas da cinética individual das células [10,17].

Desde o surgimento dessa tecnologia, vários testes para validação foram executados, especialmente em bovinos e caninos, os quais incluíam comparar o rastreamento do computador com um rastreamento visual quadro a quadro, devido à falta de outras técnicas objetivas de comparação para motilidade. Assim, era

mensurada a acurácia do rastreamento e variação da identificação dos espermatozoides. Foram realizados também testes comparando os resultados obtidos pelo CASA às TPs em bovinos, os quais confirmaram a eficiência das análises computadorizadas de parâmetros de motilidade seminal [17,34,36].

Divergência em leituras visuais e do aparelho, pode ser explicada por uma diferença entre métodos [35]. Na análise visual um espermatozoide é considerado móvel quando tem seu flagelo movimentando-se. Porém, na análise computadorizada, para que um espermatozoide seja considerado móvel, ele deve ter uma velocidade mínima, tendendo portanto as análises com o CASA a ter valores menores [37].

1.4.2. Capacidades

Os CASA atuais permitem avaliação objetiva de características espermáticas como motilidade, concentração e morfologia [10,33].

As populações de espermatozoides são divididas conforme o movimento, em: rápidos, intermediários, lentos e imóveis [38]. Entre os parâmetros de motilidade lidos pelo CASA, estão:

Velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$), que é a velocidade da trajetória real do espermatozoide, sendo a maior das três velocidades; Velocidade linear progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$), que é a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide, sendo a mais baixa das três; Velocidade média da trajetória (VAP- $\mu\text{m/s}$), que representa a velocidade da trajetória média do espermatozoide; Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH - μm), que é a amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real; Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF- Hz), que é o número de vezes em que a cabeça do espermatozoide cruza a trajetória média do movimento; Retilinearidade (STR - %), que representa a relação percentual entre VSL e VAP, estimando a proximidade do percurso da célula a uma linha reta; Linearidade (LIN - %), que é a relação percentual entre VSL e VCL, sendo que quanto mais o espermatozoide se afasta da velocidade em linha reta, menor será sua linearidade; e oscilação (WOB-%), que se refere à oscilação entre o caminho real e o caminho médio do espermatozoide (VAP/VCL)[33,38].

Apesar do grande número de dados resultantes, foi encontrada [11] correlação significativa entre porcentagem de motilidade total de sêmen de garanhões com fertilidade, o que não ocorreu para VAP, VSL, VCL e ALH.

Diversos autores tentaram correlacionar os parâmetros gerados pelo CASA à fertilidade [11,20,36,39]. Porém, isoladamente, os dados obtidos pelo CASA não podem prever com eficácia a fertilidade, visto que esta depende de diversos outros fatores e nem sempre a correlação é o teste mais adequado [11,18,39]. Ainda assim, o poder de discriminação do CASA é maior do que o fornecido por um observador humano, sendo que o sistema possui capacidade de detectar mudanças sutis [10,40].

1.4.3. Limitações

Embora o sistema tenha muitas vantagens, algumas desvantagens tornam seu uso limitado, especialmente em medicina veterinária [33,37]: o elevado custo do equipamento e a necessidade de validação, de controle de qualidade e de padronização das avaliações realizadas. Os sistemas comerciais destinados à veterinários apresentam configurações para espécies domésticas, como bovinos, equinos, suínos, ovinos, caprinos e cães, ou para espécies de laboratório, dependendo do fabricante e do software [35,41,42].

Embora o CASA esteja validado em várias espécies (domésticas e de laboratório), o sistema ainda não está inteiramente padronizado para todas as espécies de animais [33]. O espermatozoide de cada espécie difere em tamanho médio e formato de cabeça, entre outros, sendo dotados de diferentes velocidades e padrões de movimento detectados pelo CASA [10].

O CASA é muito sensível à pequenas mudanças de configuração, as quais podem acarretar uma grande diferença nos resultados. Schleh e Leoni [41] exemplificam mostrando que, ao se caracterizar um espermatozoide com movimento lento como imóvel, a motilidade encontrada é de 49, e ao se caracterizá-lo como móvel, na mesma amostra, a motilidade muda para 80. Mudanças de iluminação também interferem, pois podem iluminar partículas de sujeira e fazer com que o programa conte-as como espermatozoides imóveis.

Amann e Katz [10] ressaltam que a ótica de contraste de fase é uma parte integral de todos os CASA contemporâneos, pois permite visualização com alto contraste e detecção do limite de cada célula.

Outro fator importante é a taxa de quadros/segundo em que o vídeo é elaborado, pois algumas configurações como a velocidade da célula espermática [33] e a qualidade dos resultados [23] estão relacionadas à isso. Uma taxa de quadros/segundo maior conduz à uma maior acurácia na velocidade [23]. Houve baixa acurácia quando o sistema foi testado com espermatozoides bovinos em uma taxa de 30 quadros/segundo, recomendando-se uma taxa igual ou superior à 50 quadros/segundo [18] ou melhor ainda uma taxa de 60 quadros/segundo [10].

A câmara onde a amostra é colocada deve ter profundidade suficiente para que haja movimentação dos espermatozoides; porém, para que não desfoque e prejudique a leitura, não pode ser muito profunda [10], recomendando-se a profundidade de 0,01mm [18].

A concentração da amostra é outro fator determinante. Quanto mais diluída a amostra, menor é a acurácia do CASA, devido à superestimação do número de células pela contagem dos debris, ao passo que quando a concentração é excessivamente elevada, pode ocorrer perda de trajetos de espermatozoides móveis identificando-os como sendo de um espermatozoide próximo [33,34]. Constatou-se uma inabilidade de se obter com acurácia valores de motilidade nas amostras com concentrações maiores que $50 \times 10^6/\text{mL}$ ou menores que $20 \times 10^6/\text{mL}$ em testes com sêmen humano e de cães [35,43].

A comparação entre resultados de dois sistemas CASA diferentes é inviável, pois os resultados dependem das configurações específicas, hardware e algoritmo [18,33,44]. Portanto, vários autores [23,33,35,40,41] concordam que é essencial o detalhamento dos métodos utilizados nos testes, o que nem sempre é feito, prejudicando as interpretações e causando frustrações em pesquisadores que tentam trabalhar com os sistemas que exigem configuração manual. Há sugestão [41] de que os pesquisadores validem as configurações antes do início do experimento.

Portanto, por mais que o sistema seja objetivo e tenha se mostrado eficaz e importante na determinação de motilidade, as condições de avaliação (iluminação, taxa de quadros, concentração e tipo de câmara) devem ser consideradas [18,33]. Já para análise de concentração, o CASA não se mostrou tão preciso para humanos ou espécies domésticas, a não ser que seja feito uso de corante nas células espermáticas ou de sistema anti-colisão [30,33,37].

1.4.4. Perspectivas

Amann e Katz [10] comentam que um CASA de baixo custo poderia servir ao nicho clínico, visto que o sistema só era utilizado em cerca de 20% de laboratórios de andrologia dos Estados Unidos mesmo após 25 anos.

Amann e Waberski [18] citam como perspectiva de futuro, um sistema CASA portátil para se avaliar uma característica de motilidade e dois ou três atributos morfológicos, para profissionais que atuam fora de grandes centros e à campo. Eles citam que, aparentemente, hardware para captura de imagens e processamento de dados estão disponíveis e cita o trabalho de Tseng et al. [45], os quais utilizaram um celular para visualização de células.

Nafisi et al. [46] testaram o uso de microscópio comum com câmera diretamente na ocular, desenvolvendo um algoritmo para identificação espermática visando aplicabilidade em qualquer laboratório, porém os testes foram realizados em uma única amostra.

Visando desenvolver uma extensão (plugin) gratuita de avaliação computadorizada de sêmen [42], foram elaboradas as configurações para leitura de sêmen de Zebrafish a partir do programa ImageJ (programa gratuito de código aberto provido pelo National Institutes of Health <https://imagej.nih.gov/ij/>). Os autores validaram as análises e descreveram os componentes do sistema, sendo que esses envolviam microscópio com contraste de fase trinocular e câmera específica, disponibilizando o plugin para futuras pesquisas. Os dados resultantes do plugin incluem porcentagem de motilidade total, VCL, VAP, VSL, LIN, WOB, BCF e progressão (distância média percorrida pelo espermatozoide).

1.5. Objetivos do trabalho

Os experimentos tiveram como objetivo testar o uso do programa ImageJ e do plugin CASA de código aberto com microscópio óptico e câmera de telefone celular para realizar a análise de motilidade e concentração espermática de garanhões (ausência de configurações definidas no programa) em condições de campo.

CAPÍTULO 2

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

AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA DE GARANHÕES PELO IMAGEJ, ASSOCIADO À CÂMERA DE TELEFONE CELULAR E MICROSCÓPIO ÓPTICO

EVALUATION OF STALLION SPERM MOTILITY WITH IMAGEJ, USING CELL PHONE CAMERA AND LIGHT MICROSCOPE

RESUMO

A motilidade espermática é uma análise essencial do exame andrológico. A avaliação visual da motilidade apresenta variação mesmo entre técnicos experientes. As análises computadorizadas de sêmen (CASA) são alternativas que avaliam objetivamente as amostras, porém, possuem alto custo. O objetivo deste estudo foi testar o uso do plugin CASA de código aberto disponível no ImageJ, em condições de campo, usando microscópio óptico e câmera de smartphone, na avaliação da motilidade total dos espermatozoides de garanhão. Utilizou-se um adaptador universal de smartphones acoplado à ocular do microscópio, sendo os vídeos, gravados em 59 quadros/segundo, processados previamente (conversão, corte, remoção de fundo e aplicação de "threshold") para análise correta do plugin. Setenta amostras de sêmen equino, 22 congeladas e 48 refrigeradas, foram comparadas em seus valores totais de motilidade, obtidas com avaliação visual e plugin do ImageJ (CASAF). As amostras congeladas também foram avaliadas por um CASA comercial (CCASA). As comparações foram feitas com ANOVA, correlação de Pearson e testes de Qui-quadrado para comparar os erros do CASAF e análise visual em relação ao CCASA, com uma margem de 10%. A ANOVA não resultou em diferença estatística ($P > 0,05$) para as 70 amostras comparadas entre CASAF ($37,9 \pm 25,8$) e entre os dois avaliadores ($37,6 \pm 25,0$ e $37,5 \pm 25,5$). A comparação das 22 amostras congeladas entre CASAF ($23,36 \pm 15,9$), análise visual ($25,5 \pm 18,8$ e $25,8 \pm 18,5$) e CCASA ($25,2 \pm 18,3$) também não resultou em diferença estatística, sendo que a média dos resultados obtidos com CASAF subestimou a média obtida com o CCASA em 7,2%. A correlação entre o CASAF e o CCASA foi significativamente elevada ($r = 0,95$, $P < 0,0001$), bem como a correlação entre CASAF e análise visual ($r = 0,92$, $P < 0,0001$). O teste de Qui-quadrado resultou em proporção de acertos semelhante entre o CASAF e o CCASA ($P = 0,14$), enquanto que a análise visual resultou em proporção diferente em comparação com o CCASA ($P = 0,04$). Em que pese uma diferença no algoritmo de diferentes sistemas CASA, com CASAF foi possível obter valores de motilidade total semelhantes aos encontrados em um sistema comercial em condições de campo, sendo mais preciso do que a análise visual ao apresentar

menores erros individuais. Conclui-se que um microscópio óptico e câmera de celular são suficientes para obter vídeos de sêmen de garanhões para serem analisados com ImageJ, proporcionando resultados equiparáveis a sistemas comerciais.

Palavras chave: Sêmen. Garanhão. Motilidade. CASA. ImageJ. Smartphone.

ABSTRACT

Motility is an essential analysis of breeding soundness examination. Visual evaluation of motility can result in variation even among experienced professionals. Computer assisted semen analysis (CASA) are alternatives that evaluate samples objectively, however, they are expensive. The aim of this study was to test the use of ImageJ open source CASA plugin under field conditions, with a light microscope and cell phone camera to evaluate total percent motility of stallion sperm. A universal smartphone adapter was attached to the eyepiece of the microscope, and videos, recorded at 59 frames/second, needed previous enhancement (conversion, "crop", background subtraction and "threshold") for the program to analyse them correctly. Seventy samples of equine semen, frozen (22) and cooled (48), had their total motility values compared between visual evaluation and ImageJ plugin (CASAF). The frozen samples were also evaluated by a commercial CASA (CCASA). Comparisons were made using ANOVA, Pearson correlation and Chi-square test to compare errors of CASAF and visual analysis compared to CCASA, using a margin of 10%. ANOVA did not result in statistical difference ($P>0.05$) between 70 samples analyzed with CASAF ($37,9\pm 25,8$) and by two technicians ($37,6\pm 25,0$ and $37,5\pm 25,5$). The comparison of the 22 frozen samples between CASAF ($23,36\pm 15,9$), visual analysis ($25,5\pm 18,8$ e $25,8\pm 18,5$) and CCASA ($25,2\pm 18,3$) did not result in statistical difference either, and the average of results obtained with CASAF underestimated the average obtained with CCASA in 7,2%. The correlation between CASAF and CCASA was significantly high ($r=0,95$, $P<0.0001$), as well as the correlation between CASAF and visual analysis ($r=0,92$, $P<0.0001$). Chi-square analysis resulted in similar proportion of correct answers obtained with CASAF when compared to CCASA ($P=0,14$), while visual analysis had different proportion compared to CCASA ($P=0,04$). Even if there is a difference in algorithm of different CASA systems, it was possible to obtain values of total motility similar to the ones found in commercial programs using field conditions, being more accurate than visual analysis due to less individual errors. We conclude that a light microscope and cell phone camera are enough to obtain stallion sperm videos to be analyzed with imageJ, providing results comparable to comercial systems.

Keywords: Semen. Stallion. Motility. CASA. ImageJ. Smartphone.

1. Introdução

A avaliação da motilidade espermática é de grande importância para a área de reprodução animal [1,2]. Mesmo que a motilidade não possa ser utilizada isoladamente para prever a fertilidade potencial de um reprodutor, é essencial

para implementar técnicas comumente usadas como inseminação artificial (IA) e congelamento de sêmen [3,4].

A motilidade pode ser avaliada visualmente (metodologia subjetiva), podendo resultar em variações que chegam à 30% ou 60% devido à diferenças em treinamento e experiência [5-7].

O Computer-assisted Sperm Analysis (CASA) foi desenvolvido para reduzir a subjetividade na avaliação da motilidade, com o uso de identificação objetiva computadorizada das células espermáticas [3,8]. O sistema identifica e rastreia automaticamente as células espermáticas, gerando dados importantes e com acurácia sobre a cinética individual de cada célula [9,7]. Essa tecnologia avançada é essencial para o treinamento técnico e para ser usada em pesquisas devido ao grande número de células envolvidas, sendo mais criteriosa que o olho humano e capaz de detectar mudanças sutis nos parâmetros [10-12].

O CASA ainda não é amplamente utilizado em medicina veterinária devido ao seu elevado custo e a necessidade de padronização [7,13]. É recomendado fazer uso de um microscópio de contraste de fase e câmeras de alta velocidade (taxa de quadros/segundo) para que o software consiga detectar as células espermáticas e seus padrões de movimento [3,9,11]. Os sistemas CASA são sensíveis à pequenas mudanças de configuração e isso pode gerar significativas diferenças nos resultados. É importante padronizar corretamente as configurações para cada espécie, visto que cada uma detém célula espermática diferente [3,7,14].

As condições para avaliação das amostras de sêmen no CASA devem ser consideradas, pois os resultados podem ser afetados pela iluminação, taxa de quadros/segundo da câmera, concentração da amostra e câmara utilizada [3,7].

Amann e Waberski [3] sugerem o desenvolvimento de um CASA portátil de uso à campo, capaz de avaliar um parâmetro de motilidade e alguns atributos, para veterinários de campo. Nafisi et al. [15] testaram a utilização de um microscópio óptico comum com a câmera acoplada diretamente na ocular para melhorar o custo benefício do sistema, desenvolvendo um algoritmo para identificação espermática em imagens com baixo contraste, utilizando sêmen humano. Eles ainda relatam a falta de contraste adequado e nitidez das imagens,

sendo estas, portanto, submetidas à um processamento prévio. Primeiramente a imagem era melhorada retirando-se partículas extras, posteriormente separada do fundo, e então as células eram selecionadas baseado em medidas morfológicas e na existência de flagelo. O algoritmo não foi testado em grande número de amostras e há poucos resultados.

Wilson Leedy e Ingerman [16] desenvolveram uma extensão (plugin) de código aberto para avaliação computadorizada de sêmen, no qual eles descrevem as configurações para avaliar sêmen de Zebrafish com ImageJ (programa gratuito de código aberto provido pelo National Institutes of Health <https://imagej.nih.gov/ij/>). Eles utilizaram microscópio de contraste de fase com câmera de alta velocidade acoplada em um adaptador tipo "C-mount". O sistema foi desenvolvido para se poder diferenciar espermatozoides se movendo devido ao fluxo, dos realmente móveis. O sistema foi validado com análise visual e estatística, e então disponibilizado para futuras pesquisas.

O esperma de Zebrafish possui movimento mais suave que o de mamíferos e a acurácia foi baixa em testes do plugin gratuito com sêmen bovino em câmera de baixa velocidade (30 quadros/segundo) e microscópio óptico. Foi desenvolvido um plugin melhorando o plugin CASA do ImageJ para ser usado em câmaras microfluídicas [11].

O objetivo desse estudo foi testar e validar as configurações necessárias para avaliar a motilidade espermática de garanhões com o plugin CASA do programa ImageJ, usando condições de campo, uma câmera de celular acoplada a um microscópio de luz de light emitting diode (LED).

2. Materiais e Métodos

2.1. Microscópio e câmera

Foi utilizado um microscópio óptico (Bioptika, modelo B20, Colombo, Paraná, Brasil) com iluminação de LED, com um adaptador universal de smartphones (adaptado de: <http://www.thingiverse.com/thing:78071>) acoplado à ocular (Figura 1A). Os vídeos foram gravados com um aparelho de telephone celular (Samsung Galaxy S5, China) à 59 quadros/segundo (Figura 1B).

A



B



Fig. 1. (A) Microscópio de luz de LED com adaptador universal para smartphones acoplado à ocular. (B) Celular posicionado no adaptador para obtenção de vídeos.

2.2. Animais e coleta de amostras

As coletas de sêmen foram executadas usando éguas como manequim e vagina artificial [17]. Garanhões saudáveis, sem histórico de doenças reprodutivas, das raças Crioula, Quarto-de-Milha e Apaloosa de diferentes propriedades particulares foram utilizados nesse estudo. A idade dos animais variou de 3 a 15 anos. As propriedades localizavam-se na Região Metropolitana de Curitiba, situada no 25° 25'40 "S e 49° 16' 23 O, Paraná, Brasil. As coletas foram realizadas dentro da estação reprodutiva, entre janeiro e março de 2016. Quarenta e oito amostras refrigeradas foram avaliadas, e 22 delas foram congeladas para análise posterior, independente da motilidade apresentada na amostra refrigerada, com o intuito de se obter diferentes valores de motilidade para avaliação (aprovação do Comitê de Ética de Uso Animal da Pontifícia Universidade Católica, Paraná - registro no. 1021).

2.3. Avaliação espermática

As análises foram realizadas na porção livre de gel, após filtração. A concentração espermática foi realizada com câmara de Neubauer melhorada, como recomendado pelo CBRA [18], para fins de cálculo para refrigeração e congelamento do sêmen [17,19].

Para análises de motilidade, uma gota da amostra era colocada em lâmina e lamínula aquecidas a 37° C e o vídeo era gravado em aumento de 400x. A porcentagem de motilidade total foi o parâmetro avaliado por três métodos: avaliação visual (2 avaliadores), plugin gratuito do ImageJ [16] (CASAF) e um sistema CASA comercial (CCASA) (Hamilton-Thorne Sperm Analyzer, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA) pertencente à Universidade de São Paulo.

A avaliação da motilidade de 48 amostras refrigeradas do sêmen foi realizada visualmente por dois técnicos experientes nos vídeos gravados e, posteriormente, os vídeos foram também analisados no CASAF, com intenção de validar o sistema [8,11,14].

As 22 amostras congeladas foram avaliadas por CCASA e, com a mesma lâmina e gota, foram gravados vídeos para avaliação visual e com o CASAF. A lâmina foi mantida à 37° C no CCASA, sendo esta temperatura mantida por uma placa aquecedora no microscópio óptico, e o vídeo foi gravado no intervalo de um minuto após a avaliação pelo CCASA para evitar grandes variações.

Dessa forma, 22 amostras de sêmen congelado foram analisadas pelo CCASA, e 70 amostras, incluindo 48 amostras de sêmen refrigerado e 22 amostras de sêmen congelado, foram avaliadas visualmente e por CASAF, sendo as amostras divididas para comparação de acordo com o método de avaliação.

2.4. Configurações do CASAF

2.4.1. Processamento prévio

Para abrir os vídeos com o ImageJ é necessário o formato "mjpeg", por isso foram convertidos. Foram utilizados 120 quadros (2 segundos) de vídeo porque, quando menos quadros eram usados, muitos espermatozoides não eram contados. Como os vídeos foram gravados sem "zoom digital" da câmera de telefone celular (manutenção da qualidade), a imagem dos espermatozoides localiza-se em uma área circular do vídeo. Para resolver o problema, foi

seleciona uma área em forma de quadrado, contendo espermatozoides e utilizada a ferramenta "crop" para analisar somente a área selecionada (Figura 2).

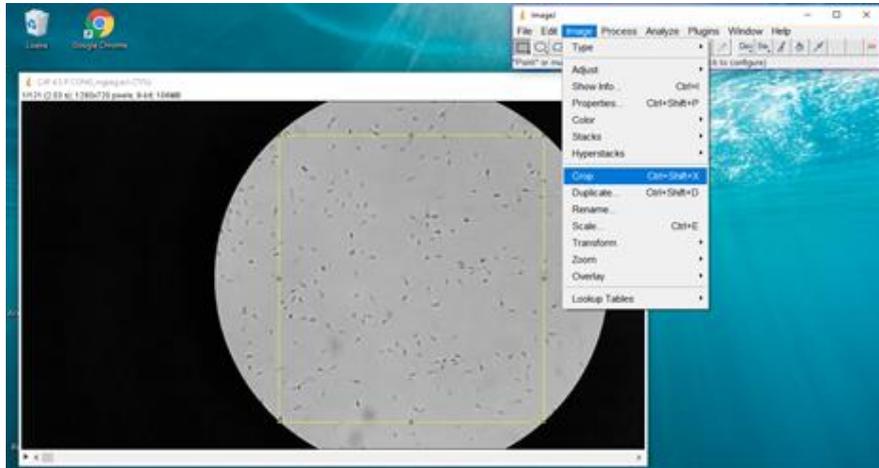


Fig. 2. Uso da ferramenta "crop" do ImageJ para selecionar área do vídeo a ser analisada com o plugin CASA [16] (CASAF).

O fundo foi então removido, permitindo que somente as cabeças dos espermatozoides permanecessem visíveis (Figura 3A).

A seguir, a imagem foi ajustada utilizando "threshold" em preto e branco, na opção "default". Isso fez com que as cabeças dos espermatozoides aparecessem pretas em fundo branco (Figura 3B). Somente então o plugin CASA era selecionado.

A

B

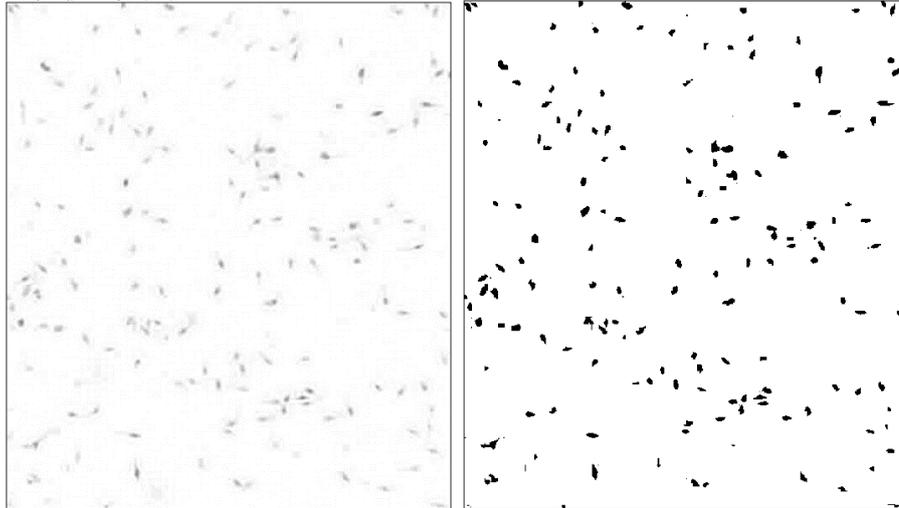


Fig. 3. (A) Espermatozoides da área a ser analisada após remoção do fundo no ImageJ. (B) Espermatozoides após uso da ferramenta "threshold" do ImageJ.

2.4.2. Configurações do plugin CASA

As configurações usadas para Zebrafish aparecem automaticamente no plugin CASA [16]. O plugin é muito específico para a configuração desenvolvida [11], não sendo capaz de identificar corretamente os espermatozoides de garanhão com os valores previamente determinados para Zebrafish.

Após experimentação e comparação visual quadro a quadro foram determinadas as modificações necessárias, elegendo os parâmetros que permitiram a melhor identificação das células espermáticas. Os valores modificados foram: "Minimum sperm size": 1. "Maximum sperm size": 250. "Minimum track length": 20. "Maximum sperm velocity between frames": 20. "Frame rate": nesse estudo, 59.

O tempo médio para analisar cada amostra, desde a conversão do vídeo até a obtenção dos resultados, foi calculado.

2.5. Análise Estatística

O teste de ANOVA foi usado, considerando as amostras pareadas, para comparar as médias de análise visual entre dois técnicos e o CASAF (70 amostras), assim como para comparar as médias dos valores das 22 amostras congeladas entre os dois profissionais, o CASAF e o CCASA. Foi calculada a porcentagem de variação de CASAF em relação à CCASA. Posteriormente o

teste de Qui-quadrado foi usado, considerando-se o CCASA como método padrão para checar os acertos e erros obtidos com o CASAF e a análise visual. Os acertos foram determinados como valores próximos aos obtidos por CCASA, em uma margem de 10% acima ou abaixo, para incluir respostas não exatas porém mantendo rigorosidade.

Foi aplicado o teste de Correlação de Pearson entre o CCASA e o CASAF, e também entre o CASAF e uma média das duas análises visuais. O software *Statgraphics Centurion XVI* (2009) foi utilizado para as análises estatísticas. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

3. Resultados e discussão

Aman e Waberski [3] comentam a importância de se disponibilizar um sistema mais acessível, para ser usado por veterinários de campo, pelo fato do sistema CCASA ser dispendioso além de ser ainda pouco utilizado. Como existe um plugin CASA gratuito disponível [16], as condições mínimas para analisar sêmen de garanhões à campo foram testadas pelo nosso grupo de pesquisa.

Em nosso estudo, o principal obstáculo foi gerar imagens de qualidade, pois as análises posteriores dependeriam fortemente disso [11,15]. Sem o microscópio de contraste de fase, as células espermáticas não são identificadas facilmente, corroborando relatos [15]. Nosso grupo detectou que mediante a luz de LED as imagens geradas eram melhores do que as produzidas por luz halógena, pois o campo era iluminado mais uniformemente, otimizando a visualização, fato este muito importante [11]. Adicionalmente, com o aumento de 400x as células espermáticas foram melhor identificadas. Para garantir que o telefone celular permanecesse imóvel durante a gravação do vídeo, foi utilizado um adaptador de fixação de câmera.

No presente estudo, a priori foi tentado realizar análise de motilidade da amostra do sêmen em uma câmara de Neubauer melhorada, visando dar condições a que os espermatozoides pudessem nadar livremente [3], e realizando a contagem espermática (concentração) simultaneamente. O movimento dos espermatozoides em uma câmara com 0,1mm de profundidade (rotineiramente utilizada) é natural, evitando a necessidade de sistemas de correção; porém esse tipo de câmara é muito profundo para ser utilizado nos

sistemas CASA [3]. As células frequentemente saem de foco, tornando a análise impossível [11], o que ocorreu no presente estudo. Por isso, foi escolhido utilizar a análise de motilidade total em uma lâmina convencional, o que permitiu que o sistema fizesse a correta identificação dos espermatozoides.

Neste estudo vários testes nas configurações do plugin CASA [16] foram executados, com o objetivo de rastrear corretamente as células móveis e identificar as células estáticas (Figura 4), antes do estabelecimento das configurações usadas.

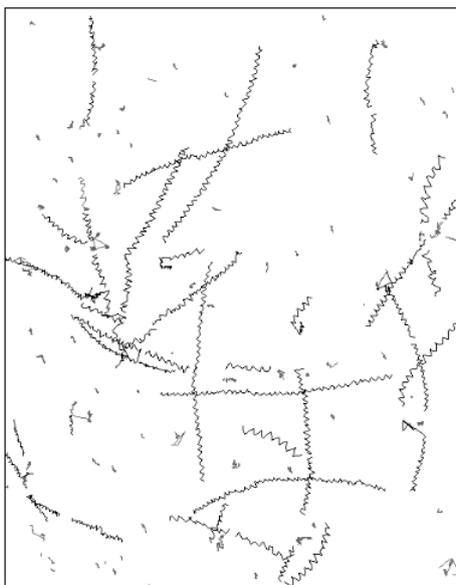


Fig. 4. Imagem obtida após a aplicação das configurações para equinos no plugin CASA do ImageJ (CASAF) [16], com o rastreamento dos espermatozoides móveis e identificação dos estáticos.

O total de amostras avaliadas apresentou motilidades variando de 0 à 99%. Em equinos a motilidade do sêmen à fresco apresenta em média 70%, enquanto que em sêmen congelado deve apresentar no mínimo 30% para ser utilizado comercialmente [18,19]. Como foram congeladas amostras sem considerar a motilidade à fresco, foram obtidos diversos valores nas análises das amostras congeladas, resultando em uma média inferior à 30% de motilidade. Para as comparações entre CASAF e análises visuais foram agrupadas as amostras refrigeradas e congeladas, pois o objetivo era a comparação dos métodos de avaliação e não dos valores de motilidade, o que resultou em uma média próxima à obtida para sêmen congelado.

Os testes de ANOVA não resultaram em diferença entre as 70 amostras visualmente estimadas (por dois técnicos) e as por meio do CASAF (P=0,93). Igualmente não houve diferença nas 22 amostras congeladas quando checadas visualmente, no CASAF e no CCASA (P=0,35) (Tabela 1), configurando-se como um achado importante, demonstrando a consistência do CASAF com os métodos rotineiros (análise visual) e objetivos (CCASA).

Tabela 1 - Motilidade total de sêmen de garanhão obtida com ImageJ CASA plugin (CASAF), avaliada por dois técnicos e pelo CASA comercial (CCASA). ($\bar{x} \pm s$ da porcentagem).

	Amostras de sêmen refrigerado e congelado $\bar{x} \pm s$ (n=70)	Amostras de sêmen congelado $\bar{x} \pm s$ (n=22)
CASAF	37,9±25,8 ^a	23,4±15,9 ^a
Observador1	37,6±25,0 ^a	25,5±18,8 ^a
Observador2	37,5±25,5 ^a	25,8±18,5 ^a
CCASA	-	25,2±18,3 ^a

Letras diferentes nas colunas representam diferenças significativas entre os grupos (P<0,05).

A correlação entre CCASA e CASAF foi significativa, positiva e elevada (r=0,95; P<0,0001), e o diagrama de dispersão está representado na Figura 5. A correlação entre CASAF e a média das análises visuais também foi significativa, positiva e alta (r=0,92; P<0,0001), demonstrando a relação do CASAF com outros métodos.

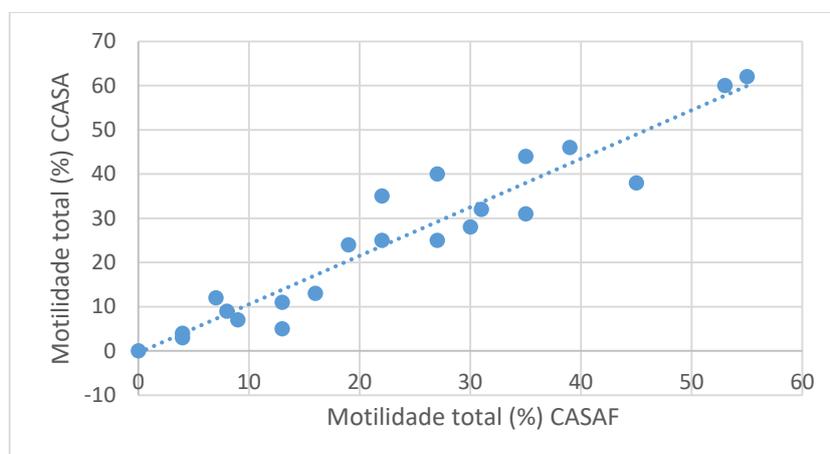


Fig. 5. Diagrama de dispersão das porcentagens de motilidade total de 22 amostras de sêmen de garanhão obtidas com CASA comercial (CCASA) e CASA plugin do ImageJ (CASAF).

Para aprofundar e estabelecer a análise estatística, testes de Qui-quadrado foram elaborados, considerando o CCASA como padrão. Muito embora diferentes sistemas CASA não devam ser comparados, devido às diferenças nos algoritmos [3,7], o objetivo no presente estudo era verificar se o CASAF seria capaz de gerar resultados similares aos obtidos em um CASA comercial para o mesmo parâmetro, sendo esta uma das razões fundamentais pelas quais foi avaliada somente a motilidade total, a qual não parece depender tão fortemente do algoritmo. Por outro lado a não-avaliação e a não-comparação entre o CCASA e a CASAF relativamente à concentração seminal no presente estudo, deveu-se ao fato de que a motilidade foi avaliada em lâmina nos dois sistemas. Portanto, a concentração foi determinada pelo método padrão (câmara de Neubauer) [18], não sendo comparada à outro método. Foram verificados resultados mais consistentes ao serem estabelecidas comparações entre dois sistemas CASA, do que entre análises subjetivas e cada CASA em si, resultando ainda assim em diferenças na ordem de 30% [20].

No presente estudo, os testes de Qui-quadrado consideraram uma variação de 10% na diferença absoluta entre os métodos, para abranger as diferenças entre sistemas e as condições de análise (à campo), mantendo a rigorosidade. Não houve diferença significativa entre os acertos e erros de CASAF comparado à CCASA ($P=0,14$), diferente da acurácia encontrada por Elsayed et al. [11], que foi baixa sem uso do contraste de fase. Eles realizaram testes com o plugin CASA gratuito [16], com e sem microscópio de contraste de fase, verificando que, sem o contraste de fase, a acurácia foi de apenas 0,5-5% para sêmen de touro.

Utilizando o Qui-quadrado para comparar estimativas visuais (média de dois técnicos) individualmente com o CCASA, foram encontradas diferenças significativas na proporção de acertos e erros ($P=0,04$), muito embora não se tenha verificado diferença entre as médias com ANOVA. Na tabela 2 as médias, o desvio padrão, subestimativas e superestimativas dos três métodos estão descritas para as amostras de sêmen equino congeladas.

Tabela 2 - Motilidade total ($x \pm s$), acertos, superestimações e subestimações de sêmen congelado de garanhão avaliado pela observação visual e plugin do ImageJ (CASAF) comparados ao CASA comercial (CCASA).

	Motilidade ($x \pm s$)	Acertos n (%)	Superestimação n (%)	Subestimação n (%)
CASAF	23,4 \pm 15,9 ^a	20/22 (91)	0/22, (0.0)	2/22 (9.0)
CCASA	25,2 \pm 18,3 ^a	22/22 (100)	0/22 (0.0)	0/22 (0.0)
Visual	25,7 \pm 18,6 ^a	16/22 (72,7)*	3/22 (13,6)*	3/22 (13,6)*

Médias e desvio padrão representam porcentagem de motilidade total; acertos e erros estão representados em números/total de amostras e porcentagem; Qui-quadrado foi feito entre CASAF e CCASA e entre análise Visual e CCASA;

* Representa diferença significativa ($P < 0,05$) entre os acertos e erros do método na linha em questão em relação ao CCASA

Letras diferentes nas colunas representam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$).

Na média, o CASAF (23,4 \pm 15,9) subestimou a porcentagem de motilidade total em 7,2% comparado ao CCASA (25,2 \pm 18,3), o que representa menor nível de problema do que se fosse a superestimação. As doses de IA são calculadas tendo como base o número de espermatozoides viáveis. Assim, a subestimação não gera uma dose inseminante com menor número de espermatozoides do que a dose mínima estabelecida, muito embora possa resultar em menor número de doses por garanhão [1]. Estudos [13] reforçam que análises computadorizadas do sêmen tendem a ser mais criteriosas e portanto os valores gerados são menores do que os obtidos com o olho humano. Nesse estudo as médias foram semelhantes, porém erros de subestimação e superestimação ocorreram na análise visual, dependendo da amostra (Tabela 2).

As médias de motilidade das três metodologias não resultaram em diferenças significativas entre si. Ao se realizar análise individualizada (Qui-quadrado) confrontando as proporções de acertos entre o CASAF e o CCASA igualmente não houve diferença; contudo nas comparações individuais entre análise visual e CCASA verificou-se diferença ($P < 0,05$). Portanto, em geral (como demonstrado pelo teste ANOVA), as análises visuais podem ser precisas, desde que processadas por profissionais experientes [3], mas quando as amostras foram comparadas individualmente ao método objetivo, foi observada

uma taxa de erro significativa. Por conseguinte a utilização de tecnologia para realizar esse tipo de análise reveste-se de importância, sendo recomendada [11].

Os desenvolvedores do plugin [16] recomendam que ele seja usado com microscópio de contraste de fase e câmeras de alta velocidade. Nosso grupo verificou que, em condições de campo, com um microscópio de luz de LED comum e uma câmera de celular (tipo Samsung Galaxy S5 ou superior), o plugin CASA gratuito [16] foi capaz de detectar e avaliar corretamente a porcentagem de motilidade total de sêmen de garanhões. Elsayed et al. [11] realizaram testes com o plugin CASA gratuito [16], relatando que os dados obtidos com leituras em microscópios ópticos ainda podem ser empregados, enfatizando contudo que microscópios de contraste de fase são superiores. Os mesmos autores também utilizaram câmeras com taxa de 30 quadros/segundo, mas o movimento lateral espermático não foi capturado de forma precisa. Para as configurações estabelecidas em nosso estudo não foi possível realizar as análises corretamente com taxa de quadros inferior à 59 quadros/segundo. Portanto, para ser possível a comparação entre diferentes sistemas CASA, Elsayed et al. [11] afirmam que a taxa de quadros deve conter no mínimo 60 quadros/segundo, como executado no presente experimento para CASAF e CCASA.

O tempo utilizado para a execução das análises no plugin foi reduzido, resultando em média de $2,17 \pm 0,07$ minutos/amostra, considerando o tempo para converter o vídeo, processar as imagens e realizar a análise.

4. Conclusão

Concluiu-se ser possível determinar a porcentagem total de motilidade espermática de garanhões com o ImageJ em condições de campo, com resultados consistentes aos verificados em sistemas comerciais; o plugin do ImageJ (disponível em código aberto), mostrou-se totalmente viável na avaliação do sêmen equino a campo, ao ser utilizado: um adaptador (fixador) universal para smartphone às lentes oculares, análise de 59 quadros/segundo, processamento das imagens e configurações do plugin adequadas para equinos, conferindo ao presente estudo aspecto inovatório; os resultados verificados entre o CCASA e o CASAF mostraram a consistência de resultados entre si;

embasado pelos resultados, o uso do CASAF foi bastante simplificado, ao se adotar um microscópio óptico com luz de LED e uma câmera de telefone celular.

5. Referências

- [1] McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. Equine reproduction. 2nd Edn. Iowa: Wiley Blackwell; 2011.
- [2] Love CC. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology* 2011;76:547-57.
- [3] Amann RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 2014;81:5-17.
- [4] Kuisma P, Andersson M, Koskinen E, Katila T. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Vet Scand* 2006;48:14.
- [5] Linford E, Glover FA, Bishop C, Stewart DL. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J Reprod Fert* 1976;47:283-91.
- [6] Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E. External quality control in the andrology laboratory: An experimental multicenter trial. *Fertil Steril* 1990;54:308-14.
- [7] Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002;57:149-79.
- [8] Amann RP, Hammerstedt RH. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol Reprod* 1980;23:647-56.
- [9] Amann RP, Katz D. Reflections on CASA after 25 years. *J Androl* 2004;25(3):317- 25.
- [10] Janson Whitesell KM, McDonnell SM, Turner RM. Modernizing the stallion breeding soundness evaluation. *J Equine Vet Sci* 2014;34:50-1.
- [11] Elsayed M, El-Sherry TM, Abdelgawad M. Development of computer-assisted sperm analysis plugin for analyzing sperm motion in microfluidic environments using Image-J. *Theriogenology* 2015;30:1-11
- [12] Lu JC, Huang YF, Lü NQ. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia* 2014;46:329-38.
- [13] Klimowicz MD, Nizanski W, Batkowski F, Savic MA. The comparison of assessment of pigeon semen motility and sperm concentration by conventional methods and the CASA system (HTM IVOS). *Theriogenology* 2008;70:77-82.

- [14] Schleh C, Leoni A. How to optimize the benefits of computer assisted sperm analysis in experimental toxicology. *J Occup Med Toxicol* 2013;8:6.
- [15] Nafisi VR, Moradi MH, Nasr-Esfahani MH. Sperm identification using elliptic model and tail detection. *World Acad Sci Eng Technol* 2005;6:205-8.
- [16] Wilson-Leedy JG, Ingermann RL. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 2007;67:661-72.
- [17] Conboy HS. Management of stallions in artificial insemination. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. *Equine reproduction*. 2nd Edn. Iowa: Wiley Blackwell; 2011,p. 1198-1207.
- [18] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2 Ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- [19] Sieme H. Freezing Semen. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. *Equine reproduction*. 2nd Edn. Iowa: Wiley Blackwell; 2011, p. 2972-2982.
- [20] Jasko DJ, Lein DH, Foote RH. A comparison of two computer-automated semen analysis instruments for the evaluation of sperm motion characteristics in the stallion. *J Androl* 1990;11:453-59.

CAPÍTULO 3

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

USO DO IMAGEJ, CÂMERA DE SMARTPHONE E MICROSCÓPIO ÓPTICO PARA AVALIAR A CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA DE GARANHÕES

USE OF IMAGEJ, SMARTPHONE CAMERA AND LIGHT MICROSCOPE TO EVALUATE STALLION SPERM CONCENTRATION

RESUMO

A concentração espermática é parte do exame andrológico, e pode ser avaliada por vários métodos. O hemocitômetro é o padrão, mas dispende tempo. Análises computadorizadas (CASA) são onerosas e necessitam de padronização. Para analisar concentração o CASA ainda é limitado à adição de corantes ou melhorias no software. O objetivo desse estudo foi testar o uso do programa de código aberto ImageJ para determinar a concentração espermática de garanhões em condições de campo, usando microscópio óptico e câmera de celular acoplada à ocular por um adaptador de smartphone. As imagens foram previamente processadas (gradeamento, corte, remoção de fundo e “threshold”) visando condições ideais de análise. Foram analisadas 108 amostras de sêmen equino à fresco com hemocitômetro (Neubauer) e ImageJ (ImageJ), usando-se fotos da mesma câmara onde foi executada a contagem. Foram analisadas 19 dessas amostras em um CASA comercial (CCASA). As comparações foram

realizadas por teste de Friedman, de Dunn, teste t pareado, correlação de Pearson e Qui-quadrado (total e entre classes de concentração: <100, 100-200, 200-300, >300 x10⁶/mL), considerando como acertos valores em uma margem de 10% do valor da Neubauer (padrão). Houve diferença na concentração média seminal entre CCASA (381,1±212,2) e Neubauer (239,4±180,3) demonstrada por teste de Dunn e teste t pareado, porém não houve diferença (Dunn) entre ImageJ (210,2±147) e Neubauer (206,1±143,7). Considerando a diferença média entre os métodos, o ImageJ superestimou a concentração obtida com a Neubauer em 1,9%, enquanto que o CCASA superestimou em 59,2%. A correlação entre ImageJ e Neubauer foi positiva e significativa (r=0,99; P<0,0001). A proporção de acertos de ImageJ e CCASA foi diferente (P<0,0001) em relação à Neubauer, tendo o ImageJ atingido 73% de acertos, e o CCASA, apenas 5%. Os erros do ImageJ comparados à Neubauer por classes foram significativos somente nos dois grupos de menores concentrações, corroborando relatos de imprecisão dos métodos computadorizados em amostras pouco concentradas, ao passo que o CCASA obteve erros de superestimação significativos em todas as classes. Devido à variação de contagem da própria câmara de Neubauer, a diferença entre ela e o ImageJ foi aceitável. Concluiu-se ser viável a análise da concentração de sêmen equino com o ImageJ, associada à microscópio de luz e câmera de celular, resultando em valores próximos aos obtidos com hemocitômetro, dispensando a necessidade da contagem manual.

Palavras chave: CASA. Concentração. Sêmen. ImageJ. Garanhão. Smartphone.

ABSTRACT

Sperm concentration is part of the breeding soundness examination, and can be assessed by various methods. Hemocytometer is considered standard, however it is time consuming. Computer assisted sperm analysis (CASA) are expensive and need standardization. The use of CASA to assess concentration is limited to the addition of dyes or improvements on the software. The aim of this study was to test ImageJ open source program to analyse concentration of stallion sperm in field conditions, with a light microscope and cell phone camera attached to the eyepiece with a smartphone adapter. Images were enhanced previously ("grid", "crop", background subtraction and "threshold") aiming ideal analysis conditions. Samples (108) of fresh equine semen were analyzed with hemocytometer (Neubauer) and ImageJ (ImageJ), using photos of the same chamber, after perform counting. Nineteen of these samples were also analyzed in a commercial CASA (CCASA). Comparisons were made using Friedman, Dunn's and paired t test, Pearson's correlation and Chi-square (total and within classes of concentration: <100, 100-200, 200-300, >300 x10⁶/mL), considering as correct, values within a margin of 10% of those obtained with Neubauer. There was significant difference between average concentration found by CCASA (381,1±212,2) and Neubauer (239,4±180,3), shown by Dunn's and paired t test, but no difference (Dunn's) between ImageJ (210,2±147) and Neubauer (206,1±143,7) was found. Considering average difference between methods, ImageJ overestimated concentration obtained with Neubauer in 1,9%, while CCASA overestimated in 59,2%. The correlation between ImageJ and Neubauer was positive and significant (r=0,99, P<0,0001). Proportion of correct answers obtained with either ImageJ or CCASA was different (P<0,0001) from Neubauer.

ImageJ achieved 73% of correct answers and CCASA only 5%. Errors of ImageJ compared to Neubauer in classes were significant only in the two groups with lower concentration, corroborating reports of imprecision of computerized methods in low concentrated samples. CCASA obtained significant overestimation errors in all classes. Since there is a variation in Neubauer chamber itself, the difference between this method and the ImageJ was acceptable. We conclude that it is possible to analyze concentration of equine semen with ImageJ using a light microscope and a cell phone camera, resulting in values close to those obtained with hemocytometer, with no need of manual counting.

Keywords: CASA. Concentration. Semen. ImageJ. Stallion. Smartphone.

1. Introduction

A concentração espermática constitui uma avaliação básica fundamental do exame andrológico, que gera informações do número de doses inseminantes e a quantidade de diluente necessário para o transporte, evento importante na utilização do sêmen em grande número de éguas [1,2].

A análise de concentração espermática pode ser executada mediante diversos métodos, destacando-se o hemocítômetro como a forma mais precisa, indicado pelo CBRA [3]. No entanto, todas as metodologias estão sujeitas à erros, uma vez que dependem de prévia diluição, pipetagem e preenchimento manual da câmara [4,5].

Testes de controle de qualidade nas contagens entre laboratórios usando o hemocítômetro mostraram uma diferença média de 37,5%, concluindo-se que as variações foram maiores em amostras pouco concentradas e menores em amostras com concentração elevada [6]. Em outro estudo [7], variações individuais de um técnico, variações entre técnicos e variações de um valor estabelecido foram de 12,5% até 16,6% em contagens com hemocítômetro. A contagem de células pelo hemocítômetro demanda em mais tempo do que outros métodos, mas o hemocítômetro é considerado padrão [3,8,9].

O sistema de análise espermática assistida por computador (CASA) é um método objetivo que utiliza "hardware" e "software" para detectar, caracterizar, rastrear e contar células em um microscópio de contraste de fase com câmera acoplada [4,10]. Apesar de ser eficiente para avaliar parâmetros de motilidade, a contagem de células com o CASA rotineiramente constituiu-se em uma

dificuldade e limitação em diversas espécies. Células com forma e tamanho similar à espermatozoides podem resultar em superestimação da concentração real, alterando em muito os resultados de amostras pouco concentradas. Em amostras com elevada concentração, algumas células podem deixar de ser contadas [11-13]. Isso pode acarretar valores superestimados ou subestimados da concentração, dependendo da amostra. Zinaman et al. [5] verificaram variação de 12,1% do CASA (comercial) em relação ao hemocitômetro.

Um valor inadequado de concentração obtida pelo CASA pode afetar a avaliação de motilidade, pois uma identificação espermática incorreta pode mudar os resultados [11]. Existe uma inabilidade do sistema (CASA) de gerar resultados precisos para amostras com concentração maior do que 50 ou menor do que 20 milhões de espermatozoides/mL [11,13]. Iguer-Ouada e Verstegen [12] utilizaram espermatozoides mortos, obtendo deste modo resultados mais acurados, o que sugere que os problemas eram devido à colisão das células se movendo. Os erros podem ser minimizados com o uso de corantes para auxiliar a correta identificação de células espermáticas, ou mediante aprimoramentos de “software”, como sistemas anti-colisão [5,14]. Verstegen et al. [11] sugerem que as amostras tenham a concentração avaliada com as células mortas, para que a amostra possa ter sua concentração ajustada para valores adequados antes da realização de análise de motilidade. Os resultados obtidos com o CASA podem ser seriamente afetados por pequenas mudanças na configuração, fazendo-se necessária a padronização dos parâmetros [11,15,16].

Amann e Waberski [4] frisam a importância de um CASA para uso à campo com somente três ou quatro análises, garantindo acessibilidade para veterinários de campo. Em um estudo [17] foi testado o uso de um microscópio óptico com câmera acoplada na ocular para melhorar o custo benefício, uma vez que os sistemas comerciais tendem a ser onerosos. As imagens foram melhoradas para melhor identificação dos espermatozoides devido à falta de contraste e nitidez. Wilson-Leedy e Ingermann [18] desenvolveram uma extensão (plugin) gratuito para o ImageJ (programa de código aberto para processamento de imagens desenvolvido pelo National Institutes of Health <https://imagej.nih.gov/ij/>), utilizando microscópio de contraste de fase para avaliar o sêmen de Zebrafish, disponibilizando o plugin para outras pesquisas.

O objetivo do presente estudo foi o de testar a capacidade do ImageJ analisar corretamente a concentração espermática de sêmen de garanhões com imagens obtidas a partir de um smartphone acoplado a um microscópio de luz sem contraste de fase.

2. Materiais e Métodos

(Estudo aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Pontifícia Universidade Católica, Paraná, no. 1021).

2.1. Microscópio e câmera

Foi utilizado um microscópio com iluminação de light emitting diode (LED) (Bioptika, modelo B20, Colombo, Paraná), com um adaptador universal para smartphones acoplado à ocular (Figura 1) (adaptado de: <http://www.thingiverse.com/thing:78071>) e as imagens foram obtidas com um smathphone (Samsung Galaxy S5).



Fig. 1. Microscópio de luz de LED com adaptador universal para smartphone, smartphone no suporte, acoplado à lente ocular.

2.2. Animais e coleta de amostras

As coletas de sêmen foram executadas usando uma égua como manequim e vagina artificial [19]. Garanhões hípidos e sem histórico de doença reprodutiva, com idade entre 3 e 20 anos, de raça Crioula, Quarto de Milha e Apaloosa de diferentes propriedades particulares foram utilizados nesse estudo, gerando um total de 108 amostras. As propriedades localizavam-se na região metropolitana de Curitiba, situada no 25° 25'40 S e 49° 16'23 O, Paraná, Brasil. As coletas foram realizadas entre março de 2015 e março de 2016, abrangendo períodos dentro e fora da estação reprodutiva.

2.3. Avaliação da concentração espermática

Para esta característica foram utilizadas três metodologias. Primeiramente, as amostras livres de gel, à fresco, foram analisadas com hemocítômetro (câmara de Neubauer melhorada) (método Neubauer). A diluição utilizada foi de 1:20 em solução formol-salina-tamponada, e foram contados 5 quadros centrais de cada lado da câmara, considerando diferença aceitável entre os dois lados de 10% [3]. Imediatamente após a contagem visual dos espermatozoides na Neubauer, as amostras foram fotografadas com o smartphone na mesma câmara (aumento 400x), em áreas sem grade, para análise posterior com o ImageJ (método ImageJ), totalizando 108 amostras avaliadas com os dois métodos (Neubauer e ImageJ). Dezenove dessas amostras foram também analisadas com o CASA comercial (CCASA) (Hamilton-Thorne Sperm Analyzer, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA) da Universidade de São Paulo, utilizando ISASD4C20L câmaras descartáveis de contagem (Proiser, Paterna, Spain).

2.4. Configurações do ImageJ

2.4.1. Processamento das imagens

Foi utilizada uma imagem das grades centrais do hemocítômetro para estabelecer o tamanho em pixels de um quadrado dentre os 25 existentes (Figura 2).

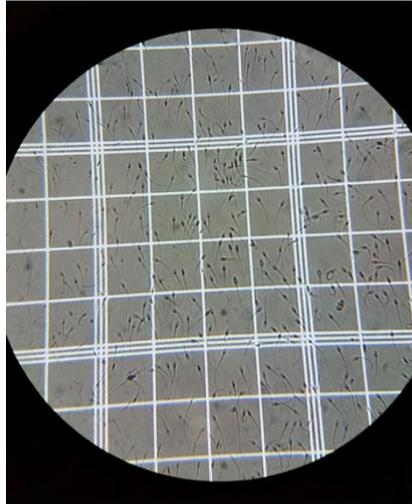


Fig. 2. Foto da área central da câmara de Neubauer para determinação do tamanho em pixels correspondente à um quadro.

Foi analisada uma foto de cada amostra, visando garantir os benefícios de tempo de análise e verificar a capacidade do programa de gerar resultados representativos e semelhantes aos obtidos após a contagem bilateral da câmara de Neubauer.

As imagens foram abertas no ImageJ na mesma matriz de pixels (resolução) em que foram tomadas (2988 x 5312). Uma vez aberta a imagem, foi utilizado o plugin “Analyse” para colocar um novo “grid”, já que a imagem a ser analisada deve ser de área sem grade. O “grid” deve ter “area per point” correspondente ao tamanho em pixels de um quadrado da câmara de Neubauer.

A área selecionada incluía dois quadrados gerados pelo “grid”, equivalentes ao tamanho de dois quadros centrais da Neubauer, que eram então posicionados no centro da imagem dos espermatozoides. A seguir era utilizada a ferramenta “crop” para contar somente células dentro do tamanho correspondente à dois quadrados (Figura 3).

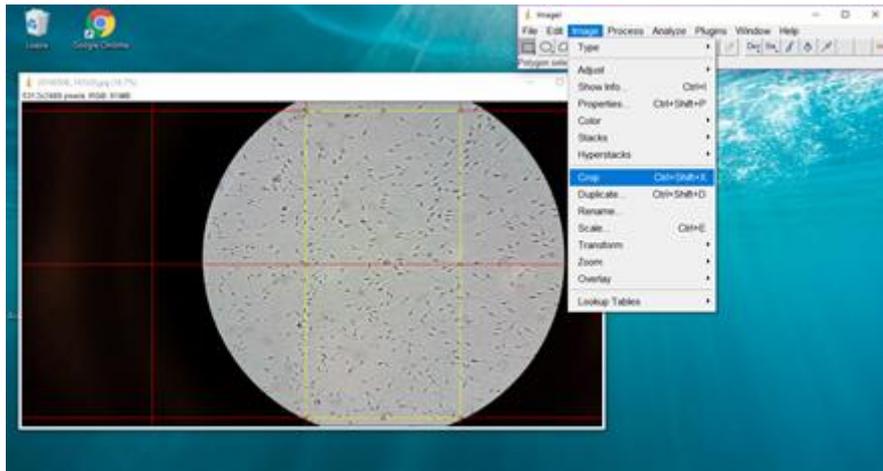


Fig. 3. Uso da ferramenta “crop” do ImageJ para selecionar o tamanho da área a ser analisada para a contagem de células espermáticas.

O fundo era removido e a imagem era ajustada com o uso de “threshold” em preto e branco, na opção “default” (Figura 4A e 4B).

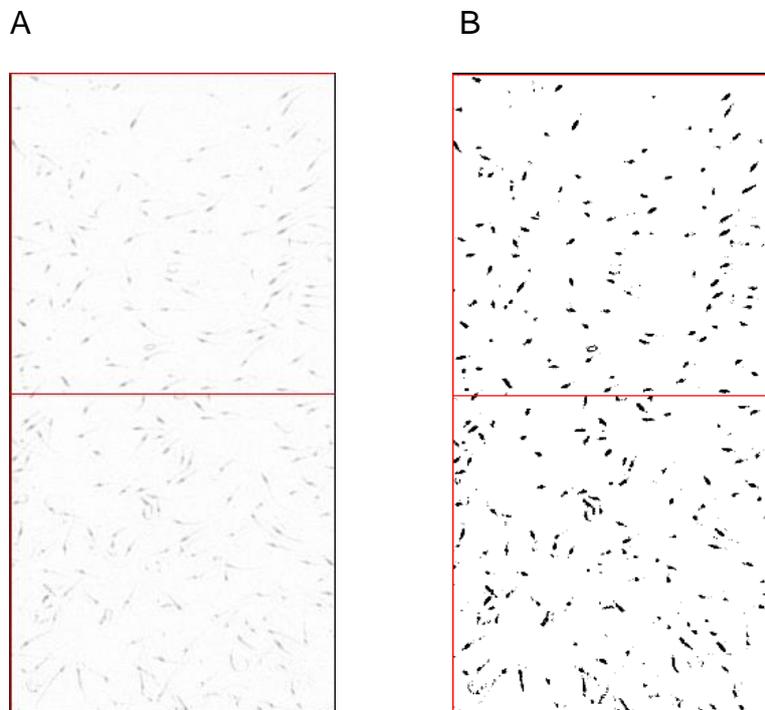


Fig. 4. (A) Área a ser analisada no ImageJ após remoção do fundo. (B) Área com espermatozoides a serem analisados no ImageJ após uso da ferramenta “threshold”.

2.4.2. Contagem espermática no ImageJ

Foi utilizada a ferramenta “analyse” e então “analyse particles”, usando o tamanho 170-Infinity e circularidade 0.0-1.00. O número total representa os espermatozoides em dois quadrados, portanto esse valor era dividido por 2, para gerar o número de células em um quadrado, e multiplicado por 5 para fornecer o número de células espermáticas em milhões/mL [3].

O tempo médio para realizar as análises no ImageJ, desde a abertura das fotos no programa até o cálculo dos resultados, foi monitorado.

2.5. Análise estatística

Os dados não assumiram a normalidade. Portanto, foram utilizados os testes de Friedman e de Dunn para comparar as médias dos três métodos, considerando as amostras pareadas. Foi usado também teste t pareado para comparar somente as 19 amostras entre CCASA e Neubauer. Foi calculada a porcentagem de variação em relação à Neubauer para o CCASA e ImageJ.

Erros individuais das amostras analisadas com ImageJ e CCASA foram calculados utilizando o teste do Qui-quadrado, considerando a Neubauer como padrão. Os valores de ImageJ e CCASA eram considerados certos quando iguais ou próximos aos obtidos pelo padrão, em uma margem de 10% acima ou abaixo do valor, já que essa margem existe para a própria câmara de Neubauer considerando a contagem dos dois lados [3]. Logo, o valor da margem foi escolhido para conferir rigorosidade semelhante à encontrada no método padrão. As amostras analisadas também foram divididas em quatro classes de concentração: abaixo de 100 milhões de células/mL; entre 100-200 milhões de células/mL; entre 200 e 300 milhões de células/mL; e acima de 300 milhões de células/mL, usando o Qui-quadrado para comparar os acertos e erros de cada classe dos métodos ImageJ e CCASA, considerando a Neubauer como padrão e uma margem de 10%.

Executou-se a correlação de Pearson e a regressão linear entre o método padrão e os métodos computadorizados. O software *Statgraphics Centurion XVI* (2009) foi utilizado para as análises estatísticas, considerando-se diferença estatística significativa ao nível de $P < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

O objetivo do corrente estudo foi verificar a possibilidade de uso do programa gratuito ImageJ para determinar a concentração espermática de garanhões em condições de campo, com o intuito de otimizar o custo-benefício, uma vez que o CASA é dispendioso. No estudo foram comparados os resultados do CCASA, do ImageJ e do método padrão (hemocitômetro-Neubauer). O maior desafio foi a obtenção de fotos em um foco adequado para que o programa pudesse executar a análise da concentração, já que o foco ideal difere do do olho humano.

Verificou-se que a análise era otimizada, quando o foco era direcionado à cabeça do espermatozoide, ao invés do direcionamento à célula espermática por inteiro (Figura 5A e 5B), pois a diferença de tonalidade na mesma célula espermática, quando muito evidente, pode ser contada como duas células distintas pelo ImageJ. Além disso, foi muito importante escolher um campo com distribuição homogênea de células. As imagens foram tiradas da mesma câmara onde foram realizadas as contagens visuais.

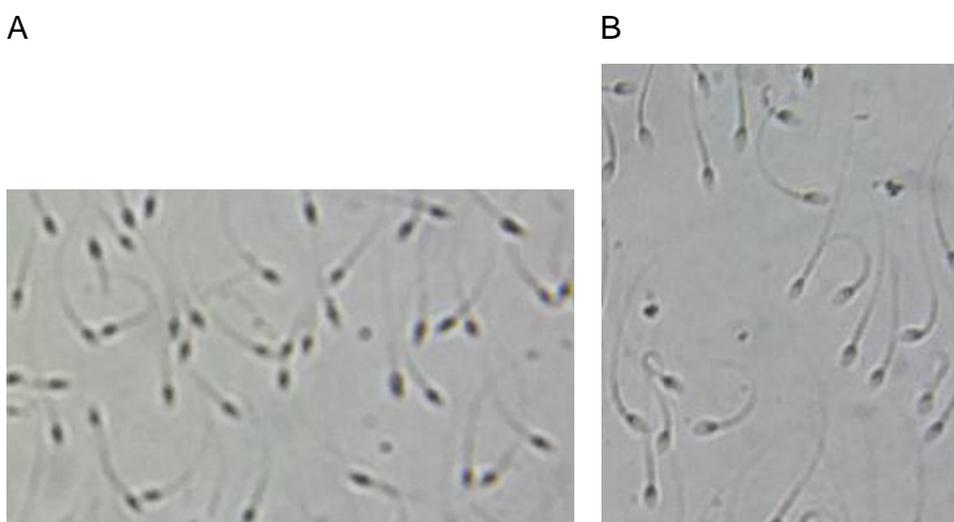


Fig. 5. (A) Foco ideal para contagem espermática utilizando o ImageJ. (B) Foco ideal para identificação espermática com o olho humano, porém inadequado para contagem com ImageJ devido à presença de diferentes tonalidades na cabeça da mesma célula.

O teste de Friedman mostrou diferença ($P < 0,0001$) entre os três métodos, ao se comparar as médias das 108 amostras analisadas com ImageJ e Neubauer,

bem como das 19 amostras analisadas com CCASA, de forma que as amostras fossem pareadas quando apresentassem dados correspondentes em outro grupo. O teste de Dunn indicou que a diferença acontecia entre o CCASA e a Neubauer e entre o CCASA e o ImageJ, não havendo contudo, diferença significativa entre o ImageJ e a Neubauer ($P > 0,05$). Para comparar somente a média das 19 amostras analisadas no CCASA à Neubauer foi realizado teste t pareado, com diferença significativa entre os métodos ($P < 0,0001$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Média e desvio padrão (milhões espermatozoides/mL) da concentração de sêmen de garanhão calculada pelo ImageJ e pelo CCASA comparados à técnica padrão (câmara de Neubauer), bem como as diferenças entre os métodos.

Amostras (n = 108)	Quantidade espermatozoide/ mL (milhões) $x \pm s$	Diferença Média (%)	Amostras (n = 19)	Quantidade espermatozoide/ mL (milhões) $x \pm s$	Diferença Média (%)
ImageJ	210,2 ± 147,0 ^a	1,9%	CCASA	381,1 ± 212,2 ^a	59,2%
Neubauer	206,1 ± 143,7 ^a		Neubauer	239,4 ± 180,3 ^b	

Diferentes letras na mesma coluna representam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).

A média das 108 amostras analisadas pelo ImageJ, superestimou os valores encontrados na Neubauer em 1,9% (Tabela 1). Por sua vez, o CCASA superestimou os valores obtidos na Neubauer para as 19 amostras, em 59,2% em média (Tabela 1), confirmando relatos de Iguer-Ouada e Verstegen [12] ao

verificarem uma superestimação de 70,0 %, usando o CASA comparado ao hemocitômetro.

Considerando que o método padrão (Neubauer) também possui uma variação aceita de 10% [3] e relatos de variações até maiores [6,7], uma variação de 1,9% no valor obtido pela Neubauer é aceitável, uma vez que a fonte do erro pode ser oriunda tanto da contagem realizada com o olho humano no hemocitômetro quanto do programa em sí.

Para investigar os erros individuais dos métodos foi feito o teste de Qui-quadrado, considerando uma variação de 10% do valor da Neubauer (considerado como padrão). Foram verificadas diferenças significativas comparando o CCASA ou o ImageJ versus Neubauer ($P < 0,0001$). O ImageJ atingiu 73,0% de acertos, ao passo que o CCASA, apenas 5%. O número de acertos, superestimações e subestimações está especificado na Tabela 2.

Tabela 2 - Números e percentual de acertos e erros das concentrações espermáticas de sêmen de garanhão, obtidas com o ImageJ ou CCASA comparados à câmara de Neubauer.

Comparação De métodos	Acertos n (%)	Superestimação n (%)	Subestimação n (%)	Valor de P
ImageJ vs. Neubauer	77/108 (73,0)	19/108 (17,6)	12/108 (11,1)	<0,000
CCASA vs. Neubauer	1/19 (5,3)	18/19 (94,7)	0/19, (0,0)	<0,000

Acertos e erros então representados em número encontrado/total de amostras e o percentual; $P < 0,05$ indica diferença significativa.

Foi observado que a maioria dos erros ocorria em amostras pouco concentradas. Devido à margem de 10% ser relativa ao valor encontrado na Neubauer, verificou-se que quanto menor a concentração, mais restrita é a

margem considerada correta. Assim, tendo como exemplo uma contagem de $20 \times 10^6/\text{mL}$ obtida pela câmara de Neubauer, valores como 23 ou $17 \times 10^6/\text{mL}$ contados pelo ImageJ já seriam considerados erros.

Devido ao número de relatos de imprecisão em amostras de baixa concentração [5,11,12], decidiu-se agrupar as amostras analisadas em quatro classes de concentração, separando os erros obtidos em cada classe [5]. O teste de Qui-quadrado foi realizado novamente em cada classe. Diferenças significativas de erros do ImageJ em relação à Neubauer só foram encontradas nos dois grupos com menor concentração (< 100 milhões de células/mL e entre 100-200 milhões de células/mL) (Tabela 3). Detectou-se que a porcentagem de erros foi inversamente proporcional à concentração, sendo menor em amostras mais concentradas. Isso indicou que o principal problema reside em amostras com concentração baixa, corroborado por autores [11,12], porém não consistente com os relatos de Zinaman et al. [5], os quais obtiveram mais erros em amostras com elevada concentração celular, empregando um sistema CASA comercial.

Tabela 3 - Números e percentuais de acertos e erros encontrados com o ImageJ, alocados em quatro classes de concentração de sêmen de garanhão, comparados à câmara de Neubauer.

	Classes de Concentração espermática (milhões/mL)			
	<100	100-200	200-300	>300
Acertos : n (%)	9/21 (42,9)*	31/43 (72,1)*	15/19 (79,0)	22/25 (88,0)
Superestimação: n (%)	8/21 (38,1)*	6/43 (13,9)*	2/19 (10,5)	3/25 (12,0)
Subestimação: n (%)	4/21,(19,0)*	6/43 (13,9)*	2/19 (10,5)	0/25 (,00)

Acertos e erros estão representados em número encontrado/total de amostras e percentual;

*Indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre acertos e erros do Imagej comparado à câmara de Neubauer dentro da classe correspondente.

Mesmo quando os resultados obtidos com CCASA foram comparados em classes à Neubauer, foi observado diferença estatística ($P < 0,05$) na proporção de

acertos em todas as classes, sendo as porcentagens de acerto: 0, 0, 0 e 20% para as classes <100, 100-200, 200-300 e >300, respectivamente.

A avaliação da concentração espermática tem sido um problema persistente ao se utilizar métodos computadorizados. Os debris podem ser contados como células espermáticas, superestimando amostras muito diluídas, ou pode ocorrer subestimação da concentração de amostras muito concentradas devido à colisão ou à outros problemas não identificados [5,11,12]. No presente experimento o erro observado do CCASA em relação à Neubauer foi de superestimação em todos os casos, possivelmente devido à inclusão de debris e células não espermáticas na contagem.

A correlação entre o ImageJ e a Neubauer (108 amostras utilizadas) foi significativamente elevada ($r= 0,99$; $P<0,0001$), assim como a correlação entre o CCASA e a Neubauer (19 amostras) ($r=0,88$; $P<0,0001$). A regressão linear está demonstrada nos diagramas de dispersão (Figuras 6 e 7). O R^2 próximo à 1 encontrado na regressão linear dos valores da Neubauer e do ImageJ representa a precisão do ajuste realizado. No entanto, a correlação é altamente influenciada por valores extremos. Na análise das 19 amostras pelo CCASA contou-se com dois valores extremamente altos, devido à variação individual entre garanhões, os quais foram excluídos, reduzindo-se a correlação para 0,63 ($P=0,005$).

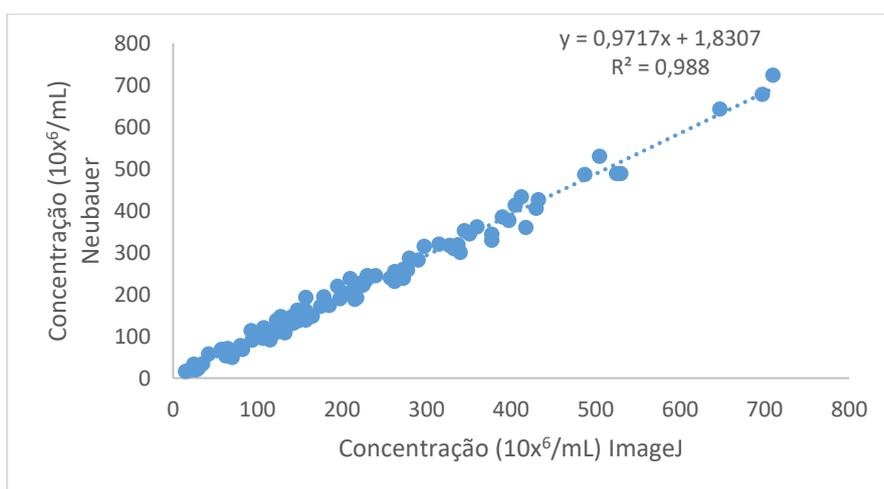


Fig. 6. Diagrama de dispersão da regressão linear das 108 amostras de semen de garanhão, obtidas pela câmara de Neubauer e ImageJ, onde “y” representa os valores encontrados na câmara de Neubauer, “x” representa os valores encontrados no ImageJ e “R²” representa o coeficiente de determinação.

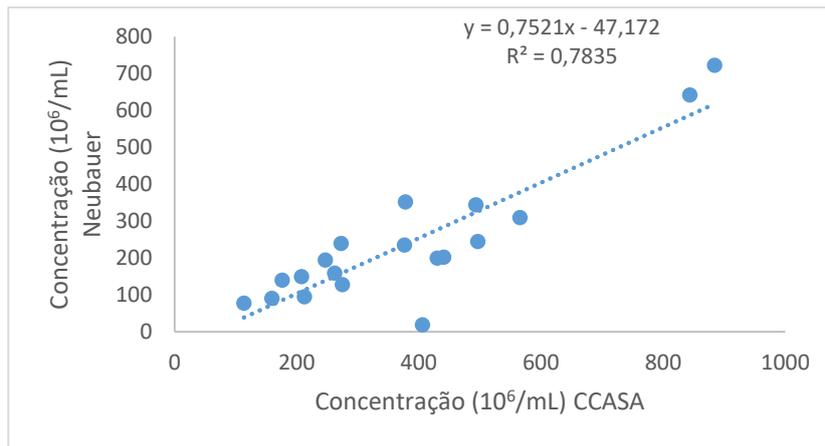


Fig. 7. Diagrama de dispersão da regressão linear das 19 amostras de semen de garanhão, obtidas pela câmara de Neubauer e pelo CCASA, onde “y” corresponde aos valores encontrados pela câmara de Neubauer, “x” corresponde aos valores encontrados no CCASA e “R²” representa o coeficiente de determinação.

Calculou-se ainda o tempo médio para a execução das análises, considerando o tempo de abertura das imagens no ImageJ até a finalização do cálculo da concentração perfazendo $58,7 \pm 5,0$ segundos, demonstrando uma vantagem quando comparado ao método tradicional de contagem das células na câmara, que exige contagem célula por célula, o que dispende tempo [20].

Em suma, o ImageJ obteve melhores resultados do que o CCASA em relação à Neubauer, pois o CCASA apresentou diferença nas médias, com variação de 59% em relação ao método padrão, obtendo proporções de erros individuais significativos em todas as classes de concentração. Já o ImageJ apresentou média semelhante, com variação de 1,9% em comparação à Neubauer e correlação alta com o método padrão, sendo encontrados erros individuais somente em classes de menor concentração, adicionalmente ao curto tempo para análise.

4. Conclusão

O ImageJ pode ser usado em condições de campo, com smartphone e microscópio de luz de LED, para avaliar a concentração espermática de garanhões após processamento das imagens (colocação de grades, corte da imagem, remoção de fundo e uso de “threshold”), resultando em dados consistentes e similares aos obtidos com hemocitômetro, excluindo-se a necessidade de contagem manual.

5. Referências

- [1] McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. Equine reproduction. 2nd Edn. Iowa: Wiley Blackwell; 2011.
- [2] Turner RM. Current techniques for evaluation of stallion fertility. *Clinical Techniques in Equine Practice* 2005;4:257-68.
- [3] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2 Ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- [4] Amann RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 2014;81:5-17.
- [5] 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;17:288-92.
- [6] Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E. External quality control in the andrology laboratory: An experimental multicenter trial. *Fertil Steril* 1990;54:308-14.
- [7] 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.
- [8] Estrada AJ, Samper JC. Evaluation of raw semen. In: Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO, editors. *Current therapy in equine reproduction*. St. Louis: Saunders; 2007, p. 253-57.
- [9] World Health Organization. *Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. 5th edn. Geneva: World Health Organization; 2010, p. 32-44.
- [10] Amann RP, Hammerstedt RH. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol Reprod* 1980;23:647-56.
- [11] Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002;57:149-79.
- [12] Iguer-Ouada M, Verstegen JP. Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology* 2001;55:733-49.

- [13] Rijsselaere T, Soom AV, Hoflack G, Maes D, Kruif A. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriogenology* 2004;62:1292-306.
- [14] Klimowicz MD, Nizanski W, Batkowski F, Savic MA. The comparison of assessment of pigeon semen motility and sperm concentration by conventional methods and the CASA system (HTM IVOS). *Theriogenology* 2008;70:77-82.
- [15] Davis RO, Katz DF. Operational standards for CASA instruments. *J Androl* 1993;14:385-94.
- [16] Schleh C, Leoni A. How to optimize the benefits of computer assisted sperm analysis in experimental toxicology. *J Occup Med Toxicol* 2013;8:6.
- [17] Nafisi VR, Moradi MH, Nasr-Esfahani MH. Sperm identification using elliptic model and tail detection. *World Acad Sci Eng Technol* 2005;6:205-8.
- [18] Wilson-Leedy JG, Ingermann RL. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 2007;67:661-72.
- [19] Conboy HS. Management of stallions in artificial insemination. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. *Equine reproduction*. 2^a Edn. Iowa: Wiley Blackwell; 2011,p. 1198-1207.
- [20] Ax RL, Dally M, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME. Avaliação do sêmen. In Hafez ESSE, Hafez B, editors. *Reprodução animal*. 7^a edn. Barueri: Manole; 2004, p. 369-79.

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sistemas computadorizados de análise espermática fornecem dados objetivos, sendo importantes em pesquisas e treinamento técnico, porém eles não são largamente utilizados em veterinária devido à seu alto custo e necessidade de padronização. Com o programa de código aberto ImageJ e o plugin CASA nele disponível, foi possível realizar análises de motilidade e concentração, bem como padronizar a configuração necessária para leitura de sêmen de garanhões em condições de campo. Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados por métodos confiáveis, sendo que foi utilizado um microscópio comum de luz com adaptador universal para smartphone acoplado na ocular. Isso reduz significativamente os custos com equipamentos e torna o método mais acessível.

Estudos comparando o uso do programa ao uso de outros métodos poderão ser realizados, podendo acrescentar melhorias em suas configurações e testá-lo para análise de outros parâmetros. Podem ser realizados experimentos futuros com outras espécies, a fim de estabelecer as configurações adequadas para cada uma, visando testar a confiabilidade do programa com diferentes espécies.

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] Ginther OJ. Reproductive efficiency. In: Ginther OJ, editor. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2nd Edn. Cross Plains, WI: Equiservices; 1993, p.499-562.
- [4] Nath LC. Reproductive efficiency. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, editors. Equine Reproduction. 2nd Edn. v. 2. Iowa: Wiley Blackwell; 2011, p. 2779-2789.
- [5] McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. Equine reproduction. 2nd Edn. Iowa: Wiley Blackwell; 2011.
- [6] Hafez ESE, Hafez B. Reprodução animal. 7th edn. Barueri: Manole; 2004.
- [7] Estrada AJ, Samper JC. Evaluation of raw semen. In: Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO, editors. Current therapy in equine reproduction. St. Louis: Saunders; 2007, p. 253-57.
- [8] Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Brinsko SP, Rigby SL. Examination of the stallion for breeding soundness. In: Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Brinsko SP, Rigby SL, editors. Manual of equine reproduction. 2nd Edn. St Louis: Mosby; 2003, p.143-64.
- [9] Ax RL, Dally M, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME. Avaliação do sêmen. In Hafez ESSE, Hafez B, editors. Reprodução animal. 7^a edn. Barueri: Manole; 2004, p. 369-79.
- [10] Aman RP, Katz D. Reflections on CASA after 25 years. J Androl 2004;25(3):317- 25.
- [11] Battut IB, Kempfer A, Becker J, Lebailly L, Camugli S, Chevrier L. Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. Theriogenology 2016;86:1111-31.
- [12] Kenney RM, Hurtgen J, Pierson R, Witherspoon D, Simons J. Society for theriogenology: manual for clinical fertility evaluation of the stallion. Nebraska: Hastings; 1983, 100p.
- [13] Fernandes CE, Pimentel CA. Características seminais e fertilidade em garanhões. Ciência rural 2002;32:829-34.

- [14] Linford E, Glover FA, Bishop C, Stewart DL. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J Reprod Fert* 1976;47:283-91.
- [15] Burns PJ, Reasner DS. Computerized analysis of sperm motion: effects of glycerol concentration on the cryopreservation of equine spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 1995;15:377-80.
- [16] Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E. External quality control in the andrology laboratory: An experimental multicenter trial. *Fertil Steril* 1990;54:308-14.
- [17] Amann RP, Hammerstedt RH. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol Reprod* 1980;23:647-56.
- [18] Amann RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 2014;81:5-17.
- [19] Jasko DJ, Little TV, Lein DH, Foote RH. Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). *J Am Vet Med Assoc* 1992;200:979-85.
- [20] Love CC. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology* 2011;76:547-57.
- [21] Janson Whitesell KM, McDonnell SM, Turner RM. Modernizing the stallion breeding soundness evaluation. *J Equine Vet Sci* 2014;34:50-1.
- [22] 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.
- [23] Elsayed M, El-Sherry TM, Abdelgawad M. Development of computer-assisted sperm analysis plugin for analyzing sperm motion in microfluidic environments using Image-J. *Theriogenology* 2015;30:1-11
- [24] Tretipskul C, Buranaamnuay K, Koonjaenak S, Tummaruk P, Techakumphu M. The use of computer-assisted sperm analysis for discriminating series of motility pattern of frozen-thawed boar semen. *Thai J Vet Med* 2010;40:25-30.
- [25] Kavak A, Johannisson A, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H, Aidnik M, Einarsson S. Evaluation of criopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Anim Reprod Sci* 2003;76:205-16.
- [26] Padilla AW, Foote RH. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. *J Anim Sci* 1991;69:3308-13.

- [27] Ellington J, Scarlett J, Meyers-Wallen V, Mohammed HO, Surman V. Computer-assisted sperm analysis of canine spermatozoa motility measurements. *Theriogenology* 1993;40:725-33.
- [28] Wilhelm KM, Graham JK, Squires EL. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analysis, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology* 1996;46:559-78.
- [29] Turner RM. Current techniques for evaluation of stallion fertility. *Clinical Techniques in Equine Practice* 2005;4:257-68.
- [30] 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;17:288-92.
- [31] World Health Organization. *Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. 5th edn. Geneva: World Health Organization; 2010, p. 32-44.
- [32] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2 Ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- [33] Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002;57:149-79.
- [34] Iguer-Ouada M, Verstegen JP. Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology* 2001;55:733-49.
- [35] Davis RO, Katz DF. Operational standards for CASA instruments. *J Androl* 1993;14:385-94.
- [36] Budworth PR, Amann RP, Chapman PL. Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *J Androl* 1988;9:41-54.
- [37] Klimowicz MD, Nizanski W, Batkowski F, Savic MA. The comparison of assessment of pigeon semen motility and sperm concentration by conventional methods and the CASA system (HTM IVOS). *Theriogenology* 2008;70:77-82.
- [38] World Health Organization. *Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. 5th edn. Geneva: World Health Organization; 2010, p. 136-41.

- [39] Kuisma P, Andersson M, Koskinen E, Katila T. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Vet Scand* 2006;48:14.
- [40] Lu JC, Huang YF, Lü NQ. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia* 2014;46:329-38.
- [41] Schleh C, Leoni A. How to optimize the benefits of computer assisted sperm analysis in experimental toxicology. *J Occup Med Toxicol* 2013;8:6.
- [42] Wilson-Leedy JG, Ingermann RL. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 2007;67:661-72.
- [43] Rijsselaere T, Soom AV, Hoflack G, Maes D, Kruif A. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriogenology* 2004;62:1292-306.
- [44] Jasko DJ, Lein DH, Foote RH. A comparison of two computer-automated semen analysis instruments for the evaluation of sperm motion characteristics in the stallion. *J Androl* 1990;11:453-59.
- [45] Tseng D, Mudanyali O, Oztoprak C, Isikman SO, Sencan I, Yaglidere O, et al. Lensfree microscopy on a cellphone. *Lab chip* 2010;10:1787-92.
- [46] Nafisi VR, Moradi MH, Nasr-Esfahani MH. Sperm identification using elliptic model and tail detection. *World Acad Sci Eng Technol* 2005;6:205-8.

ANEXO

Guia resumido para submissão de artigo para a revista *Teriogenology*

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents](#) for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plugins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/theriogenology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13.03.03].

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

Journal Abbreviation Source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word

abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>