

ANÁLISE ESPERMÁTICA COMPUTADORIZADA COMO FERRAMENTA DE CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES

COMPUTERIZED SPERM ANALYSIS AS A SPECIES CONSERVATION TOOL

Roberta Pampolha Athayde¹
Fabrício Quaresma de Sousa²
Aryadne de Lima Rodrigues³
Danuza Leão Leite⁴
Josye Bianca Santos⁵
Adriana Novaes dos Reis⁶
Sheyla Farhayldes Souza Domingues⁷

Área Temática 5: Meio ambiente, Mudanças Climáticas e Sustentabilidade
Modalidade: Artigo Científico

Resumo

O sistema CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*) representa um avanço tecnológico para análises objetivas da qualidade seminal, com aplicações relevantes na conservação de espécies. Este estudo teve como objetivo avaliar a morfometria da cabeça espermática de *Saimiri collinsi* com auxílio do CASA, evidenciando sua aplicabilidade como ferramenta diagnóstica em programas de manejo reprodutivo. Foram utilizados seis machos adultos, submetidos à coleta seminal por eletroejaculação. As amostras foram avaliadas em três momentos: *in natura*, diluído e após resfriamento. Foram analisados 900 espermatozoides no módulo *morphology* do software SCA (*Sperm Class Analyzer*), com mensuração dos parâmetros lineares (área, perímetro, comprimento e largura) e derivados (elipticidade, alongação, rugosidade e regularidade). O CASA permitiu identificar variações sutis entre etapas, revelando sua sensibilidade para detectar alterações morfométricas. Esses dados reforçam o potencial do sistema CASA para estudos com animais silvestres e sua aplicabilidade na seleção de reprodutores, construção de bancos genéticos e na conservação de espécies ameaçadas.

Palavras-Chave: Morfometria espermática, Reprodução assistida, Conservação *in situ*, Conservação *ex situ*, Macaco-de-cheiro.

¹ Universidade Federal do Pará, robertapamathayde@gmail.com

² Universidade Federal do Pará; fabricioquaresma63@gmail.com

³ Universidade Federal do Pará, aryadne.l.rodrigues@gmail.com

⁴ Centro Nacional de Primatas, danleao.88@gmail.com

⁵ Universidade Federal do Pará, josyebasantos@gmail.com

⁶ Universidade Federal do Pará, areis@ufpa.br

⁷ Universidade Federal do Pará, shfarha@ufpa.br

Abstract

The CASA system (Computer-Assisted Sperm Analysis) represents a technological advancement for objective assessments of semen quality, with relevant applications in species conservation. This study aimed to evaluate the sperm head morphometry of *Saimiri collinsi* using CASA, highlighting its applicability as a diagnostic tool in reproductive management programs. Six adult males were used, and semen was collected via electroejaculation. Samples were evaluated at three time points: fresh (in natura), diluted, and after cooling. A total of 900 spermatozoa were analyzed using the morphology module of the SCA software, with measurements of linear parameters (area, perimeter, length, and width) and derived indices (ellipticity, elongation, roughness, and regularity). CASA enabled the detection of subtle variations between stages, demonstrating its sensitivity in identifying morphometric changes. These findings reinforce the potential of the CASA system for research in wildlife species and its applicability in the selection of breeders, development of genetic banks, and conservation of endangered species.

Key words: Sperm morphometry, Assisted reproduction, *In situ* conservation, *Ex situ* conservation, Squirrel monkey.

1. Introdução

A análise computadorizada de espermatozoides, ou simplesmente, CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*) representa um importante avanço tecnológico na avaliação seminal, proporcionando medições objetivas, reprodutíveis e padronizadas da motilidade e da morfometria espermática (Singh; Kumar; Bisla, 2021; Yániz; Soler; Santolaria, 2015). Desenvolvido originalmente para reduzir a subjetividade dos métodos convencionais, o CASA permite a mensuração precisa de parâmetros como motilidade total, motilidade progressiva, velocidades lineares e indicadores de trajetória, além de fornecer dados sobre a morfologia celular com alta sensibilidade (Potiens, 2022; Yániz; Soler; Santolaria, 2015).

Além dos parâmetros cinemáticos, módulos como o ASMA (*Automated Sperm Morphometry Analysis*) permitem a análise detalhada da cabeça, peça intermediária e cauda espermática, sendo capazes de identificar subpopulações celulares com diferentes potenciais reprodutivos, aspecto crítico em espécies com elevada heterogeneidade seminal, como alguns primatas neotropicais (Singh; Kumar; Bisla, 2021; Yániz; Soler; Santolaria, 2015).

O uso do CASA tem se mostrado cada vez mais relevante em contextos conservacionistas por sua precisão analítica que permite detectar alterações ultraestruturais decorrentes de manipulações como a criopreservação, facilitando a escolha de protocolos mais eficientes para a manutenção da viabilidade celular (Singh; Kumar; Bisla, 2021; Yániz; Soler; Santolaria, 2015). Além disso, por mensurar características associadas ao potencial fertilizante, o sistema auxilia na seleção de reprodutores com melhor desempenho (Potiens, 2022), o que é essencial para otimizar cruzamentos e reduzir a erosão genética em programas de conservação *in situ* e *ex situ* (Singh; Kumar; Bisla, 2021).

Dessa forma, o CASA consolida-se como uma ferramenta diagnóstica promissora não apenas na reprodução assistida, mas também na conservação de espécies, ao permitir a seleção de espermatozoides morfológicamente superiores e a construção de bancos genéticos mais eficientes (Singh; Kumar; Bisla, 2021). Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a morfometria da cabeça espermática de *Saimiri collinsi* utilizando o sistema CASA, demonstrando sua capacidade em detectar alterações sutis entre etapas de processamento seminal e sua aplicabilidade em estratégias de manejo reprodutivo e conservação genética de primatas neotropicais.

2. Metodologia

Aspectos éticos e local de estudo

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelos órgãos ambientais competentes (SISBIO/ICMBio/MMA nº 69137-1) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto Evandro Chagas (nº 25/2019). As amostras de sêmen foram coletadas e processadas no Laboratório de Reprodução Animal do Centro Nacional de Primatas (CENP-Ananindeua/PA), com análises complementares realizadas no Laboratório de Biotecnologia e Medicina de Animais da Amazônia (BIOMEDAM-Castanhal/PA).

Animais e coleta seminal

Foram utilizados seis machos adultos da espécie *Saimiri collinsi*, mantidos em cativeiro sob condições padronizadas de manejo. O sêmen foi coletado por eletroejaculação sob anestesia (cetamina 20 mg/kg + xilazina 1 mg/kg, via intramuscular).

Processamento seminal e morfometria espermática

O processamento seminal obedeceu ao protocolo já descrito por Oliveira et al., 2015. Para análise morfométrica foram preparadas lâminas de esfregaço utilizando 5 μL de coloração rosa bengala e 5 μL da amostra seminal em lâminas de vidro pré-aquecidas a 37 °C, das três etapas do resfriamento seminal (IN, AR, PR). As lâminas foram selecionadas com base na maior concentração espermática e em critérios de qualidade óptica.

Foram fotografados 50 espermatozoides por lâmina, totalizando 900 células analisadas. As imagens foram capturadas com câmera acoplada ao microscópio de campo claro (NIKON *Eclipse Ni-U*), com objetiva de imersão a óleo (100x), e analisadas diretamente pelo *software SCA (Sperm Class Analyzer)*, no módulo *Morphology*, que mensura automaticamente os seguintes parâmetros da cabeça espermática: área (μm^2), que corresponde à superfície ocupada pela cabeça espermática em duas dimensões; perímetro (μm), comprimento total da borda da cabeça; comprimento (μm), que é o eixo longitudinal maior da cabeça; e largura (μm), que é eixo transversal menor da cabeça.

Além dos parâmetros lineares, o software também calculou quatro índices derivados, que descrevem a forma e a simetria da cabeça: elipticidade, que é a razão entre o comprimento e a largura, indicando a ovalização da célula; alongação, que representa o grau de alongamento da cabeça; rugosidade, que é o índice de irregularidade da borda espermática; e regularidade, que é a medida de simetria geométrica da cabeça.

Os critérios de análise seguiram recomendações técnicas para CASMA (Potiens, 2022; Yániz; Soler; Santolaria, 2015), sendo as imagens processadas para maximizar o contraste entre célula e fundo, assegurando contornos precisos e minimizando artefatos. Os espermatozoides selecionados estavam íntegros, com cabeça claramente delimitada e sem sobreposição de estruturas ou resíduos.

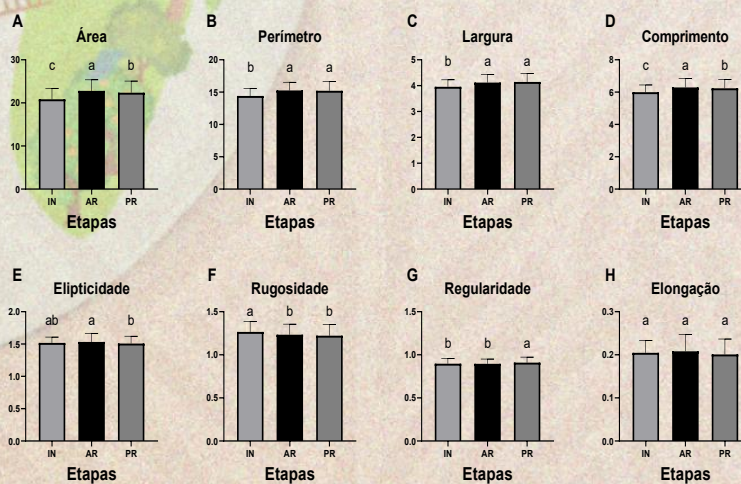
Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e analisados no software GraphPad Prism 9.3.1. Foi aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre os grupos (IN, AR, PR) foram feitas por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para área, perímetro, comprimento, largura, elipticidade, alongação e regularidade. Para rugosidade, foi utilizada ANOVA de um fator com pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

3. Resultados/Discussões

A **figura 1** demonstrou que avaliação morfométrica da cabeça dos espermatozoides de *Saimiri collinsi* feita através de sistema CASA, apresentou diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre pelo menos duas etapas do processamento seminal. A área espermática foi significativamente maior em AR ($25,9 \pm 1,6 \mu\text{m}^2$) em comparação com IN ($24,2 \pm 1,4 \mu\text{m}^2$), não diferindo de PR ($25,2 \pm 1,5 \mu\text{m}^2$). O perímetro apresentou aumento em AR ($21,2 \pm 0,9 \mu\text{m}$) em relação a IN ($20,3 \pm 0,8 \mu\text{m}$), sem diferença significativa em relação a PR ($20,9 \pm 0,9 \mu\text{m}$). A largura foi menor em IN ($3,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$) quando comparada a AR ($4,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$), que por sua vez não diferiu de PR ($4,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$). O comprimento foi superior em IN ($7,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$), decrescendo em AR ($6,9 \pm 0,2 \mu\text{m}$) e PR ($7,0 \pm 0,2 \mu\text{m}$), ambos estatisticamente distintos do grupo inicial. A elipticidade também demonstrou redução significativa de IN ($1,9 \pm 0,1$) para PR ($1,7 \pm 0,1$), sendo AR ($1,8 \pm 0,1$) estatisticamente intermediário. Já a rugosidade foi mais elevada em AR ($1,3 \pm 0,1$), diferindo de IN ($1,2 \pm 0,1$) e PR ($1,2 \pm 0,1$). A regularidade foi maior em PR ($1,1 \pm 0,1$) em relação a IN ($1,0 \pm 0,1$), enquanto AR ($1,0 \pm 0,1$) não diferiu dos demais. Por fim, o parâmetro alongação manteve-se constante entre as etapas, sem variações estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Figura 1. Média (\pm DP) da morfometria espermática em espermatozoide de *Saimiri collinsi* mensuradas a partir do CASA.



^{a-c} Letras minúsculas diferentes no mesmo gráfico indicam diferença estatística ($p < 0,05$). IN: *In natura*. AR: Antes do Resfriamento. PR: Pós-Resfriamento.

A avaliação morfométrica da cabeça dos espermatozoides de *Saimiri collinsi* utilizando o sistema CASA revelou diferenças estatisticamente significativas entre as etapas do processamento seminal, evidenciando a sensibilidade do método para detectar variações sutis que poderiam passar despercebidas em análises subjetivas. Essas alterações indicam efeitos morfoestruturais induzidos pelas etapas de resfriamento, reforçando a necessidade de ajustes técnicos para preservar a integridade celular.

A capacidade do sistema CASA de mensurar automaticamente muitos de espermatozoides por amostra, com eliminação de variabilidade inter e intraobservador, representa um avanço frente às análises subjetivas, permitindo resultados mais padronizados e confiáveis (Rijsselaere et al., 2012; Yániz; Soler; Santolaria, 2015). Essa precisão é essencial na avaliação de células de espécies silvestres, muitas vezes com disponibilidade limitada de material seminal (Morrell; Hodges, 1998).

Além disso, os parâmetros derivados do lineares, como elipticidade, regularidade e rugosidade, que são calculados automaticamente, oferecem subsídios para avaliar aspectos ultraestruturais da célula, como simetria e compactação nuclear, os quais influenciam diretamente o sucesso reprodutivo (Riveros et al., 2023). No presente estudo, tais alterações forneceram dados fundamentais para o aprimoramento dos protocolos de criopreservação e para a construção de bancos de germoplasma com células de melhor qualidade.

Informações que são especialmente relevantes para espécies ameaçadas, como primatas neotropicais, cuja manutenção da variabilidade genética é vital para a sustentabilidade populacional (Morrell; Hodges, 1998). A aplicabilidade do CASA em espécies de interesse conservacionista tem sido comprovada em diversos contextos, por exemplo, em estudos com o leopardo-arábico (*Panthera pardus nimr*), uma espécie criticamente ameaçada, o CASA foi utilizado para caracterizar a motilidade e morfologia espermática, permitindo a identificação de subpopulações celulares com maior potencial fecundante (Baqir et al., 2018).

Em mamíferos marinhos, como o peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*), o CASA foi empregado para estabelecer parâmetros de referência da qualidade espermática, auxiliando na avaliação da saúde reprodutiva de populações em cativeiro e na natureza. essas informações

são cruciais para o desenvolvimento de estratégias de manejo e conservação dessas espécies vulneráveis (Cowart et al., 2020).

Além disso, o CASA tem sido aplicado com sucesso em espécies aquáticas, como o peixe-zebra (*Danio rerio*), onde a análise automatizada da motilidade espermática contribuiu para a compreensão dos efeitos de contaminantes ambientais na fertilidade masculina, esses dados são essenciais para avaliar o impacto de poluentes na reprodução de espécies aquáticas e implementar medidas de conservação adequadas (Kollár; Horváth; Csenki-Bakos, 2021).

Esses exemplos ilustram o potencial do sistema não apenas como ferramenta diagnóstica, mas como instrumento estratégico para subsidiar decisões em programas de reprodução assistida e conservação genética. No caso do *Saimiri collinsi*, as variações identificadas entre as etapas do processamento seminal destacam a importância de monitoramento preciso para selecionar células com maior potencial reprodutivo, reforçando o uso do CASA como um aliado fundamental na conservação de espécies ameaçadas.

4. Considerações Finais ou Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que o sistema CASA é uma ferramenta altamente útil para a análise morfométrica espermática em *Saimiri collinsi*. A tecnologia permitiu a mensuração objetiva e padronizada de parâmetros da cabeça espermática, possibilitando uma caracterização precisa do sêmen da espécie. Essa precisão é fundamental em contextos conservacionistas, onde a seleção de reprodutores com maior potencial fecundante pode impactar diretamente a eficácia de programas de manejo genético e reprodução assistida.

A capacidade do sistema em analisar grandes quantidades de células de forma automatizada contribuiu para o avanço das práticas de conservação, oferecendo dados confiáveis para a formação de bancos genéticos e para a tomada de decisões em projetos de reprodução. Dessa forma, este estudo reforça a importância do CASA como ferramenta estratégica na conservação de primatas neotropicais e outras espécies ameaçadas.

5. Referências Bibliográficas

BAQIR, Baqir *et al.* Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) in the Critically Endangered Captive Arabian Leopard (*Panthera pardus nimr*): A Multivariate Clustering Analysis. **Journal of Veterinary Science & Technology**, v. 09, n. 02, 2018.

COWART, Jonathan R. *et al.* Manual Collection and Semen Characterization in a West Indian Manatee (*Trichechus manatus*). **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 569993, 2020.

KOLLÁR, Tímea; HORVÁTH, Ákos; CSENKI-BAKOS, Zsolt. Computer-Assisted Sperm Analysis to Test Environmental Toxicants. *In*: DOSCH, Roland (Org.). **Germline Development in the Zebrafish**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US, 2021. v. 2218 p. 29–35.

MORRELL, J. M.; HODGES, J. K. Cryopreservation of non-human primate sperm: priorities for future research. **Animal Reproduction Science**, v. 53, n. 1–4, p. 43–63, out. 1998.

OLIVEIRA, K. G. *et al.* Seminal characteristics and cryopreservation of sperm from the squirrel monkey, *Saimiri collinsi*. **Theriogenology**, v. 84, n. 5, p. 743–749.e1, set. 2015.

POTIENS, José Roberto. **Análises computadorizadas da motilidade espermática (CASA): conceitos e possibilidades de padrões**. Disponível em: <<https://www-periodicos-capes-gov-br.ez3.periodicos.capes.gov.br/index.php/acervo/buscaador.html?task=detalhes&source=&id=W4285175882>>. Acesso em: 7 jul. 2024.

RIJSSELAERE, T. *et al.* Computer-Assisted Sperm Analysis in Dogs and Cats: An Update after 20 Years. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. s6, p. 204–207, dez. 2012.

RIVEROS, José Andrés Nivia *et al.* Sperm head morphometry and chromatin alterations in bulls with different conception rates. **Animal Reproduction Science**, v. 255, p. 107275, ago. 2023.

SINGH, A. K.; KUMAR, A.; BISLA, A. Computer-assisted sperm analysis (CASA) in veterinary science: A review. **The Indian Journal of Animal Sciences**, v. 91, n. 6, p. 419–429, 16 set. 2021.

YÁNIZ, J. L.; SOLER, C.; SANTOLARIA, P. Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 156, p. 1–12, maio 2015.