

USO DO SOFTWARE LIVRE IMAGEJ PARA ANÁLISE DE SÊMEN

Maria Eduarda Teixeira Rocatto (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Adalgiza Pinto Neto (UFFS-Realeza), Antonio Campanha Martinez (Orientador). E-mail: ra127543@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Umuarama, PR.

Ciências Agrárias, Medicina Veterinária.

Palavras-chave: bovino; CASA; plugin.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade do software ImageJ extraído com o plugin CASA gratuito, na análise de motilidade e parâmetros cinemáticos de espermatozoides bovinos descongelados. Foram analisadas 14 amostras de sêmen criopreservado, descongeladas em banho-maria a 37 °C, sendo realizadas duas análises, a primeira através do processamento de vídeos gravados com resolução 4K a 60 fps, por meio de um smartphone acoplado a um microscópio sem contraste de fase e outra com o aparelho portátil CASA AndroScope®, considerado seus resultados como parâmetro de validação do plugin CASA gratuito. A motilidade total não apresentou diferença significativa entre os dois métodos, sugerindo que o ImageJ pode fornecer uma avaliação confiável para este parâmetro. Entretanto, os parâmetros cinemáticos VCL, VAP, VSL, LIN, WOB/STR e BCF diferiram significativamente, com superestimação das velocidades, linearidade e BCF e subestimação do WOB/STR pelo ImageJ. Conclui-se que o uso do software de código aberto é viável para avaliação da motilidade total em condições de campo, oferecendo uma alternativa acessível aos sistemas CASA convencionais, mas limitações em relação à análise detalhada de cinética espermática devem ser consideradas.

INTRODUÇÃO

Atualmente a produção e comercialização brasileira de sêmen bovino têm apresentado crescimento constante. Em 2024, segundo o INDEX ASBIA ((Associação Brasileira de Inseminação Artificial), aproximadamente 25,3 milhões de doses de sêmen foram comercializadas no mercado interno, representando um acréscimo de 2,6% em relação a 2023. Com o aumento da inseminação artificial e a maior exigência dos produtores, o processo de criopreservação demanda avaliações espermáticas mais precisas, a fim de garantir a qualidade, viabilidade e eficiência reprodutiva das amostras. A biotecnologia, sistema de análise de espermatozoides assistida por computador (CASA), mostrou-se altamente eficaz em pesquisas do mundo inteiro, é aplicada para a avaliação objetiva da motilidade, dos parâmetros cinemáticos e da concentração espermática de ejaculados. No entanto, o alto custo dos equipamentos e requisitos tecnológicos limita sua aplicação em condições de

campo, o que dificulta avaliações rápidas ou procedimentos de congelação de sêmen fora do laboratório (Belala *et al.*, 2024).

Como alternativa, Wilson-Leedy e Ingermann (2007) desenvolveram um plugin gratuito para o software ImageJ (National Institutes of Health, <https://imagej.nih.gov/ij/>), inicialmente utilizado na avaliação de sêmen da espécie Zebrafish em microscopia de contraste de fase, posteriormente foi adaptado para análise em diferentes espécies e contextos, descritos na literatura. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade do programa ImageJ associado ao plugin CASA gratuito na avaliação de motilidade e cinética espermática de palhetas de sêmen bovino, utilizando imagens obtidas por meio de um smartphone acoplado a um microscópio óptico comum.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizando um suporte para celular e um smartphone (iPhone 11 câmera traseira) o experimento foi realizado no Laboratório de Criação e Reprodução Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM), campus de Umuarama – Fazenda.

Foram analisadas 14 amostras de palhetas de sêmen bovino criopreservadas de 0,25 ml, descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Para cada amostra, realizaram-se duas análises simultâneas de motilidade e parâmetros de movimento espermático. Na primeira, uma alíquota de 5 µL de sêmen foi depositado em lâmina de vidro pré-aquecida, coberta com lamínula, e posicionada sobre uma platina aquecedora a 37°C (Eletovet®, São Paulo), acoplada ao microscópio óptico (Motic®) com um aumento de 400 vezes. Os vídeos foram gravados em resolução 4K (3840 × 2160 pixels) a 60 fps, tiveram duração de 15 segundos cada, posteriormente foram processados no software ImageJ.

Para a segunda análise, a partir da mesma palheta, o sêmen foi depositado na lâmina pré aquecida do aparelho portátil CASA AndroScope®, (Minitube, Alemanha), que fornece em tempo real parâmetros da cinética espermática. Os dados obtidos no AndroScope® foram considerados como parâmetro de referência para comparação com o plugin CASA de código aberto.

Os vídeos provenientes da primeira análise foram processados no software livre ImageJ (<https://imagej.net/ij/>), utilizando o plugin *CASA_.java*, inserido na pasta *plugins*, compilado e executado. Como o programa é compatível apenas com os formatos AVI e MJPEG, os arquivos originais foram convertidos e ajustados para duração de 3 segundos de duração para permitir a leitura. O protocolo seguido foi o mesmo descrito por Wilson-Leedy e Ingermann (2007). Os parâmetros do *Sperm Tracker* do plugin foram configurados com área mínima de 1 e máxima de 250 pixels, comprimento mínimo de rastreamento de 20 quadros e velocidade máxima de deslocamento de 60 pixels/s. Os valores de corte para VSL, VAP e VCL foram definidos, em 10, 15 e 25 µm/s, respectivamente. Para a definição das subpopulações, os valores máximos de VAP para espermatozoides lentos e médios foram estabelecidos em 30 e 50 µm/s. A taxa de aquisição foi de 60 quadros por segundo. Esses ajustes tiveram como base principal os parâmetros descritos por Del Prete *et al.* (2022) e Freitag *et al.* (2020).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 apresenta o resultado estatístico pelo Test t de Student para comparação das médias destas duas amostras.

Tabela 1: Parâmetros da cinética espermática obtidos no Androscope® e Software Image J

Parâmetro	ImageJ		Androscope		p
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
Motilidade	53,27	±15,95	56,68	±19,78	0,65
VCL	258,22	±111,06	95,29	±22,74	<0,001
VAP	93,63	±30,50	44,11	±12,75	<0,001
VSL	67,27	±21,55	36,82	±12,10	<0,001
LIN	0,70	±0,06	0,40	±0,07	<0,001
WOB/STR	0,38	±0,08	0,79	±0,06	<0,001
BCF	21,97	±2,82	12,42	±2,00	<0,001

De acordo com os resultados, para a motilidade total, não houve diferença significativa entre o Androscope ($56,68 \pm 19,78\%$) e o ImageJ ($53,27 \pm 15,95\%$) ($p = 0,65$), sugerindo resultados semelhantes para esse parâmetro. Esse achado sugere que o ImageJ pode ser uma alternativa viável para mensurar a motilidade total, corroborando com outros relatos da literatura (Giaretta *et al.*, (2016); Freitag *et al.*, (2020)).

Entretanto, para os parâmetros cinemáticos VCL, VAP, VSL, LIN, WOB/STR e BCF, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,001$) entre os dois métodos. O ImageJ apresentou valores mais altos de VCL, VAP, VSL, LIN e BCF, indicando superestimação das velocidades espermáticas e retilinearidade das trajetórias e apresentou valores inferiores de WOB/STR, possivelmente relacionados às diferenças no processamento e suavização das trajetórias.

Em síntese, considerando o Androscope como referência, o ImageJ apresentou boa concordância apenas para a motilidade total, mas superestimou a maioria dos parâmetros cinemáticos. Esses achados indicam que, embora o ImageJ possa ser empregado para avaliações rápidas a campo, o mesmo só apresenta funcionalidade para avaliação da motilidade total. Comprovando nesse estudo que, o uso do código aberto pode ser apropriado em contextos de campo ou triagem inicial, para análise de motilidade total, não sendo confiável na análise dos parâmetros cinemáticos.

CONCLUSÕES

O uso de um smartphone acoplado em um microscópio ótico comum, o programa ImageJ resultou boa concordância apenas para a motilidade total, mas superestimou velocidades (VCL, VAP, VSL), linearidade (LIN) e BCF, enquanto subestimou WOB/STR ao ser comparado com o Androscope®.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao programa PIBIC-CNPq/UEM, CAPES e Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS

ASBIA – Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Index. **Anuário ASBIA de Genética Bovina 2025**. Veículo oficial da Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Coordenação geral: Lilian Matimoto. Jornalista responsável: Altair Albuquerque (MTb 17.291). Uberaba: ASBIA, 2025.

BELALA, R.; BOURAHMOUNE, D.; MIMOUNE, N. The use of Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) in domestic animal reproduction: **Jornal of Kafkas Universitesi**, Turkey v. 26, n. 1, p. 9-17, 2020. Disponível em: https://www.vetdergikafkas.org/uploads/pdf/pdf_KVFD_L_3148.pdf. Acesso em: 18 ago. 2025.

DEL PRETE, C.; MARI, G.; BLANCO PRIETO, O.; COCCHIA, N.; MISLEI, B.; GASSPARRINI, B.; IACONO, E.; MERLO, B.; BUCCI, D. Assessment of an open-access CASA software for bovine and buffalo sperm motility analysis. **Theriogenology**, Italy, v. 67, p. 661-672, jul/out. 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432022001683>. Acesso em: 18 ago. 2025.

FREITAG, G.P.; LIMA G.F.; KOZICKIL, L.E.; FELICIO L.C.S.; WEISS, R.R. Evaluation of stallion sperm motility with ImageJ using a cell phone camera and a light microscope. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Curitiba/PR, v. 72, n. 6, p. 1923-1932, nov./dez. 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/qdQW5XWMSZ6vgH8p6T59rtv/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 18 ago. 2025.

GIARETTA, E.; MUNERATO, M.; YESTE, M.; GALEATI, G.; SPINACI, M.; TAMANINI, C.; MARI, G.; BUCCI, D. Implementing an open-access CASA software for the assessment of stallion sperm motility: Relationship with other sperm quality parameters. **Animal Reproduction Science**, v. 176, p. 11-19. Ago/Nov. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432016303141> Acesso em: 12 ago. 2025.

WILSON-LEEDY, J. G.; INGERMANN, R. L. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. **Theriogenology**, Moscow, v. 67, n. 3, p. 661-672, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X06005504>. Acesso em: 18 ago. 2025.