

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**CARACTERIZAÇÃO ESPERMÁTICA E
PADRONIZAÇÃO DO SISTEMA
COMPUTADORIZADO PARA AVALIAÇÃO DA
CINÉTICA DO *Arapaima gigas* (Schinz, 1822)**

Edilson Dias Moreira

Jaboticabal – São Paulo

2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**CARACTERIZAÇÃO ESPERMÁTICA E
PADRONIZAÇÃO DO SISTEMA
COMPUTADORIZADA PARA AVALIAÇÃO DA
CINÉTICA DO *Arapaima gigas* (Schinz, 1822)**

Edilson Dias Moreira

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Sanches

Coorientador: Dr. Lucas Simon Torati

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre

Jaboticabal – São Paulo

2025

M838c	Moreira, Edilson Dias Caracterização espermática e padronização do sistema computadorizado para avaliação da cinética do Arapaima gigas (Schinz, 1822) / Edilson Dias Moreira. -- Jaboticabal, 2025 63 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal Orientador: Eduardo Antônio Sanches Coorientador: Lucas Simon Torati 1. CASA. 2. Sêmen. 3. Reprodução. 4. Pirarucu. 5. Motilidade. I. Título.
-------	---

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

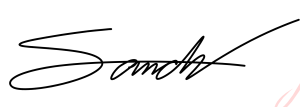
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Caracterização espermática e padronização do sistema computadorizado para avaliação da cinética do *Arapaima gigas* (Schinz, 1822)

AUTOR: EDILSON DIAS MOREIRA

ORIENTADOR: EDUARDO ANTÔNIO SANCHES

COORIENTADOR: LUCAS SIMON TORATI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, Área de Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



Assinado de forma digital por
EDUARDO ANTONIO
SANCHES:05482916910
Dados: 2025.11.27 16:47:08 -03'00'

Prof. Dr. EDUARDO ANTÔNIO SANCHES (Participação Virtual)
Departamento de Recursos Pesqueiros e Aquicultura / UNESP / Câmpus de Registro - FCAVR



Documento assinado digitalmente
ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA
Data: 27/11/2025 22:02:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia e Zootecnia / UNESP / Câmpus de Ilha Solteira - FEIS



Documento assinado digitalmente
ALEXANDRE NIZIO MARIA
Data: 27/11/2025 22:20:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. ALEXANDRE NIZIO MARIA (Participação Virtual)
Embrapa Tabuleiros Costeiros / Aracaju/Sergipe

, 27 de novembro de 2025.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, pelo apoio incondicional em cada etapa da jornada. Aos amigos e colegas que contribuíram com palavras de incentivo e colaboração. E, acima de tudo, àqueles que acreditaram no meu potencial mesmo nos momentos mais desafiadores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força, sabedoria e perseverança que me sustentaram durante esta jornada.

Aos meus pais, irmãos, avós e sobrinho, pelo amor, compreensão e apoio incondicional, que tornaram possível a realização deste sonho.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Eduardo A. Sanches (Unesp), pelo apoio técnico, pelas discussões científicas e pela colaboração essencial durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo A. Sanches, pela orientação, dedicação e incentivo, e por acreditar no meu potencial durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Lucas Simon Torati, pela coorientação, disponibilidade e valiosas contribuições científicas, bem como pelo apoio e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira, UNESP – Câmpus Registro, pela infraestrutura disponibilizada, pelo acesso aos materiais e pelo uso dos laboratórios de aquicultura.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), pelo suporte acadêmico e pelos conhecimentos transmitidos durante o período de pós-graduação, que contribuíram de forma significativa para meu crescimento profissional e científico.

À Embrapa Pesca e Aquicultura, pelo acolhimento, pelo suporte e pela generosa disponibilização de materiais, laboratórios e exemplares, que foram essenciais para a execução deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88887.955748/2024-00.

Por fim, agradeço aos amigos que estiveram presentes durante esta jornada, compartilhando desafios, conquistas e aprendizados e contribuíram para o sucesso deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares.”

Josué 1:9

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sonda Foley utilizada para fazer o bloqueio do canal urinário do <i>A. gigas</i> . Onde a parte inflada foi posicionada dentro da bexiga urinária.....	20
Figura 2. Imagem demonstrando a presença dos “cistos” espermáticos no sêmen do pirarucu. A: vídeo original B: vídeo editado no VirtualDub. Setas pretas indicam os cistos e as vermelhas destacam células espermáticas.	26
Figura 3. Dendograma da distância Euclidiana, a partir das variáveis analisadas do sêmen fresco do <i>A. gigas</i>	27
Figura 4. Resultado da taxa de motilidade (%) e a velocidade média de deslocamento (VAP) de espermatozoides de <i>A. gigas</i> analisados com 1s (100 frames) avaliados após 10s de ativação. As diferentes combinações testadas para considerar o espermatozoide como móvel foram: 1) VSL=5, VAP=7, VCL=10; 2) VSL=6, VAP=8, VCL=12; 3) VSL=8, VAP=10, VCL=15; 4) VSL=10, VAP=12, VCL=15; 5) VSL=10, VAP=12, VCL=20; 6) VSL=10, VAP=15, VCL=20; 7) VSL=10, VAP=15, VCL=25; 8) VSL=10, VAP=15, VCL=30; 9) VSL=10, VAP=15, VCL=40; 10) VSL=12, VAP=20, VCL=30; 11) VSL=12, VAP=20, VCL=40; 12) VSL=14, VAP=25, VCL=35; 13) VSL=14, VAP=25, VCL=40; 14) VSL=16, VAP=30, VCL=40; 15) VSL=18, VAP=35, VCL=45.....	31
Figura 5. Valores testados para o parâmetro d (máxima velocidade entre frames - pixels) para seis machos 10 segundos pós ativação com avaliação de 50 frames.....	32
Figura 6. Comparação de imagens das trajetórias espermáticas geradas e importadas do software ImageJ/ZProject (esquerda), imagens importadas do <i>plugin</i> CASA (direita). Comparações realizadas 10s pós-ativação para 25 frames (0,25s) (A e B) e para 100 frames (1s) (C e D). comparações realizadas 35s pós-ativação para 25 frames (E e F) e para 100 frames (G e H).	34
Figura 7. Imagem da trajetória obtida no CASA com quatro células espermáticas de <i>A. gigas</i> isoladas e sua classificação de acordo com seus respectivos valores para velocidade curvilínea (VCL), média de deslocamento (VAP), velocidade em linha reta (VSL): A) estática; B) lenta; C) intermediária e D) rápida.	36
Figura 8. Células espermáticas de <i>A. gigas</i> expostas a análise de integridade da membrana, onde as células intactas apresentaram a coloração branca.....	37
Figura 9. Imagens de morfologia ótica (100x) de células espermáticas de <i>A. gigas</i> . A: Normal; B: Cabeça solta; C: Cauda dobrada parte inicial; D: Cauda solta; E: Cauda	

enrolada parte final; F: Cauda enrolada peça intermediária; G: Uma das caudas quebradas;
H: Cauda corrugada; I: Cauda curta; J: cauda dobrada parte final..... 39

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Diferentes combinações testadas para determinar a configuração dos parâmetros e, f e g na caixa de diálogo (Sperm Tracker) do CASA.	24
Tabela 2. Caracterização dos clusters com base em parâmetros de motilidade espermática.	28
Tabela 3. Estatística descritiva de espermatozoides de <i>A. gigas</i> para a identificação de células estáticas, lentas, intermediárias e rápidas. Avaliação após 0,5s (50 pixels).	29
Tabela 4. Configurações usadas na caixa de diálogo do CASA (Sperm Tracker), para caracterização de parâmetros espermáticos do <i>A. gigas</i> , com vídeos gravados em objetiva de 20x a 100 frames por segundo. Configuração utilizada para avaliação de 0,5s de vídeo ou 50 frames.	35
Tabela 5. Parâmetros seminais de <i>A. gigas</i> utilizados para avaliação espermática.	37
Tabela 6. Alterações morfológicas dos espermatozoides do <i>A. gigas</i>	38
Tabela 7. Parâmetros de osmolaridade para amostra de sêmen e urina do <i>A. gigas</i>	39

Resumo

Diante da importância do *Arapaima gigas* para a produção aquícola aliada à lacuna de conhecimentos sobre a qualidade de gametas da espécie, o objetivo foi avaliar suas características espermáticas e realizar a padronização da configuração do *plugin* CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) do *software* ImageJ para avaliação da cinética espermática. Neste sentido, 21 machos de pirarucu com massa de $38,60 \pm 11,50$ kg e um comprimento de $1,55 \pm 0,13$ m tiveram amostras coletadas. Para a coleta do sêmen, adotou-se o procedimento de esvaziar a bexiga urinária com auxílio de uma sonda uretral. Em seguida, travou-se o canal urinário com uma sonda Foley. O sêmen coletado foi utilizado para avaliação dos normalidade espermática ($48,9 \pm 15,4$ % de normais), concentração ($5,63 \pm 1,0 \times 10^{10}$ spz.mL⁻¹) e integridade da membrana espermática ($59,1 \pm 10,9$ % de íntegros). Realizou-se também a ativação espermática e a captura de vídeos (100 fps) de movimentação para caracterizar a cinética espermática (CASA/ImageJ). Para isso, determinou-se os valores mínimos das velocidades em linha reta (VSL), média de deslocamento (VAP) e curvilínea (VCL) para caracterizar células como móveis. Verificou-se que a combinação dos valores de VSL=10 $\mu\text{m.s}^{-1}$; VAP=15 $\mu\text{m.s}^{-1}$ e VCL= 40 $\mu\text{m.s}^{-1}$ permitiu considerar as células como móveis de forma mais coerente em comparação com avaliação visual. Além disso, células espermáticas de *A. gigas* podem ser definidas em rápidas quando apresentam VCL > 238 $\mu\text{m.s}^{-1}$, intermediárias entre 131 e 237 $\mu\text{m.s}^{-1}$, lentas entre 41 e 131 $\mu\text{m.s}^{-1}$ e estáticas abaixo de 41 $\mu\text{m.s}^{-1}$.

Palavras-chave: CASA, sêmen, reprodução, pirarucu, motilidade.

ABSTRACT

Given the importance of *Arapaima gigas* in aquaculture production and the existing gap of knowledge regarding gamete quality, this study aimed to evaluate its sperm characteristics and to standardize the configuration of CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) plugin in the ImageJ software for assessing sperm kinetics. Semen samples were collected from 21 males weighing 38.60 ± 11.50 kg and measuring 1.55 ± 0.13 m in length. For semen collection, the urinary bladder was first emptied using a urethral catheter, followed by the insertion of a Foley catheter to block the urinary canal. The collected semen was used to evaluate normal sperm morphology (48.9 ± 15.4 % normal), sperm concentration ($5.63 \pm 1.0 \times 10^{10}$ spz.mL⁻¹), and membrane integrity (59.1 ± 10.9 % intact). Sperm activation and video capture (100 fps) were performed to characterize sperm kinetics using CASA/ImageJ. Minimum velocity thresholds for straight-line (VSL), average path (VAP), and curvilinear (VCL) velocities were established to classify motile cells. The combination of VSL = 10 $\mu\text{m.s}^{-1}$, VAP = 15 $\mu\text{m.s}^{-1}$, and VCL = 40 $\mu\text{m.s}^{-1}$ provided the most accurate identification of motile cells. Moreover, sperm cells of *A. gigas* can be classified as fast when VCL > 238 $\mu\text{m.s}^{-1}$, intermediate between 131-237 $\mu\text{m.s}^{-1}$, slow between 41-131 $\mu\text{m.s}^{-1}$, and static below 41 $\mu\text{m.s}^{-1}$.

Keywords: CASA, semen, reproduction, pirarucu, motility.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Aspectos gerais sobre o <i>Arapaima</i>	13
1.2	Característica seminal	14
1.3	Análise espermática assistida por computador (CASA)	16
2	OBJETIVO GERAL.....	18
2.1	Objetivos específicos.....	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	Local de estudo, plantel avaliado e método de coleta	18
3.2	Análises seminais e espermáticas	20
3.3	Procedimentos de ativação espermática e gravação de vídeos.....	21
3.4	Configuração do CASA.....	22
3.5	Categorização da motilidade espermática	22
3.6	Obtenção dos dados individuais das células.....	22
3.7	Ajuste de parâmetros para avaliação da motilidade	22
3.8	Máxima velocidade entre os frames	23
3.9	Análise comparativa das trajetórias espermáticas	23
3.10	Dinâmica espermática ao longo do tempo pós-ativação	24
3.11	Análise estatística	24
4	RESULTADOS.....	24
4.1	Aspectos técnicos da caracterização.....	25
4.2	Análise de cluster.....	26
4.3	Classificação do movimento espermático.....	29
4.4	Combinações de velocidade mínimas.....	31
4.5	Máxima velocidade entre frames.....	32
4.6	Comparação das trajetórias dos espermatozoides.....	32
4.7	Ajustes dos parâmetros do CASA.....	34
4.8	Representação dos padrões de motilidade.....	35
4.9	Caracterização seminal, morfológica e cinética.....	36
5	DISCUSSÃO.....	40

6	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspecto gerais sobre *Arapaima*

Arapaima gigas pertence a um clado de teleósteos primitivos que inclui também o *Heterotis niloticus*, ambos caracterizados pela capacidade de realizar respiração aérea (Nelson et al., 2016). O pirarucu é considerado o maior peixe de água doce com escamas, podendo atingir mais de 3,5 m e 250 kg (Núñez et al., 2018). O pirarucu adulto tem um corpo cilíndrico e comprimido sendo gradualmente achatado lateralmente na nadadeira dorsal até a caudal, tem a cabeça achatada na região dos olhos e possui uma relação de 10% com o corpo (comprimento total) (Silva et al., 2016). Pode ser encontrado na bacia Amazônica no Brasil, Peru, Equador e Colômbia, também teve sua introdução em outros países como Tailândia e Malásia (Da Costa Amaral et al., 2020).

O pirarucu tem boas características ao seu favor, grande potencial para piscicultura devido a sua rusticidade, respiração aérea obrigatória, rápido crescimento, alcançando 7 kg a 10 kg em um ano e ausência de espinhas em sua carne contribui para o alto valor de mercado (Rebelatto Junior et al., 2015). O rendimento de filé pode chegar a 50% (Fogaça et al., 2011; Rodrigues et al., 2015), suporta altas densidades de estocagem (Cavero et al., 2003; Brandão et al., 2006; Rodrigues et al., 2015). Em condições de cativeiro o pirarucu apresenta tolerância ao aumento da concentração de amônia até 25 mg/L, com 100% de sobrevivência (Silva et al., 2016).

Contudo, apesar do seu grande potencial, entraves reprodutivos limitam sua produção em larga escala (Lima et al., 2015). Além disso, a limitação de disponibilidade de formas jovens é um dos principais fatores limitantes da expansão do setor aquícola, o que, por sua vez, também aumenta a pressão sobre os estoques naturais (Torati et al., 2017). Lima (2018) reforça que a produção é limitada pela baixa disponibilidade de juvenis e alto custo, uma vez que informações sobre sua biologia reprodutiva são escassas.

Na maioria dos teleósteos, as gônadas de machos e fêmeas são órgãos pares, alongados, envoltos por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, localizado dorsalmente na cavidade celomática (Koulsh et al., 2002; Souto et al., 2017). Assim como outros osteoglossídeos, em *A. gigas*, somente a gônada esquerda é funcional (Torati et al., 2024). O testículo do pirarucu durante o período reprodutivo é alongado, com diâmetro máximo de 1-1,5cm e está situado próximo à bexiga natatória (Godinho et al., 2005).

Torati et al. (2024) relata a primeira coleta com sucesso de sêmen *in vivo* desta espécie sem estimulação hormonal, e descreve o sêmen como sendo translúcido e viscoso. O mesmo autor em estudo pioneiro descreve o espermatozoide do pirarucu como sendo uma célula biflagelada composta por uma cabeça esférica, uma região de peça intermediária curta e dois flagelos. Esta característica está fortemente relacionada com a duração da motilidade (Yao et al., 1999). O espermatozoide biflagelado é relativamente incomum, já foi observado em 31 espécies de peixes de sete ordens (Montgomerie et al., 2009). Torati (2024) ressalta a falta de informações sobre os aspectos gerais das características do sêmen na espécie, o que dificulta o desenvolvimento de biotecnologias, como criopreservação de sêmen, necessária para garantir a produção contínua de formas jovens e, assim, controlar sua produção em cativeiro. A ordem Osteoglossiformes se destaca por oferecer uma boa oportunidade para investigar a relação entre competição espermática e morfologia, por incluir espermatozoides monoflagelados, biflagelados e aflagelados (Koenig et al., 2021).

A presença de espermatozoides biflagelados no pirarucu representa uma condição incomum entre os peixes teleósteos, este fator o torna um modelo espermatólogico relevante para o estudo das relações entre morfologia espermática e padrões de motilidade.

1.2 Característica Seminal

Os espermatozoides de *A. gigas* apresentam morfologia biflagelada, uma condição rara entre teleósteos que pode exercer influência direta sobre padrões de motilidade e desempenho cinético. A presença de dois flagelos tende a alterar a dinâmica de propulsão celular, configurando uma adaptação estrutural relevante para a compreensão da diversidade funcional dos espermatozoides em peixes.

A qualidade espermática tem grande importância no processo de reprodução artificial, refletindo diretamente no sucesso da fertilização (Figueroa et al., 2016; Costa et al., 2022). Nos machos, a quantidade do sêmen (volume e concentração) e a qualidade (motilidade, pH do plasma seminal, composição e estabilidade da membrana, e integridade do DNA) podem determinar a capacidade de fertilização e o sucesso reprodutivo (Kowalski et al., 2019). O conhecimento desses parâmetros permite avaliar a qualidade do sêmen coletado e, assim otimizar sua utilização no processo de fertilização artificial (Murgas et al., 2011).

A obtenção do sêmen de machos maduros pode ser feita através do método de sucção com seringa ou espermiação direta, que consiste, basicamente, em “espremer” ou massagear o abdome do peixe, no sentido crânio-caudal (Mendes et al., 2023). O volume total do sêmen e a concentração de espermatozoides mostram diferenças entre espécies e dentro de indivíduos de mesma espécie, representando variações inter e intraespecíficas (Kowalski et al., 2019). A concentração de espermatozoides é definida como número de espermatozoides/mL (Viveiros et al., 2009), geralmente é avaliada através da contagem de espermatozoides em câmara hermatimétrica de Neubauer (Santos, 2022).

Os espermatozoides permanecem imóveis quando ainda nos testículos dos peixes (Cosson, 2010). As estimativas da taxa de motilidade são avaliadas observando-se a movimentação dos espermatozoides imediatamente após a introdução de uma solução ativadora, pois o tempo de motilidade geralmente é curto (Santos, 2022). São muitos os meios de ativação utilizados para induzir a motilidade e avaliação do sêmen fresco em peixes, sendo um dos mais comuns a água destilada (Viveiros et al., 2009). Em geral, sêmen de alta qualidade deve apresentar motilidade dos espermatozoides acima de 80%, entretanto, os valores desse parâmetro podem ser menores e podem diferir significativamente entre indivíduos e entre espécie (Kowalski et al., 2019).

Em nível subcelular, a qualidade do sêmen pode ser avaliada pela integridade da membrana plasmática dos espermatozoides (Fauvel et al., 2010). A integridade da membrana espermática é essencial para a motilidade dos espermatozoides influenciando diretamente sua capacidade de alcançar e fertilizar os oócitos (Spica, 2025). A integridade da membrana tem sido estudada pela avaliação da capacidade de penetração diferencial de corantes, como eosina/nigrosina (Fauvel et al., 2010), essa técnica classifica os espermatozoides como viáveis ou inviáveis, e é baseada na permeabilidade celular e, portanto, espermatozoides viáveis (vivos) permanecem incolores enquanto os não viáveis (mortos) permitem a penetração do corante corando a célula de rosa (Santos, 2022).

A morfologia dos espermatozoides de peixe pode auxiliar na caracterização de amostras seminais, fazendo inferência sobre seu potencial fertilizante (Miliorini, 2006; Murgas et al., 2015). A morfologia espermática expressa o percentual de espermatozoides normais e com anormalidades morfológicas (Costa et al., 2022). Anormalidades espermáticas estão associadas às deficiências funcionais do espermatozoide, como redução da motilidade e vigor espermático, e habilidade de fecundação (McAllister et al.,

2003; Shiro Junior, 2013). As principais anormalidades avaliadas nos espermatozoides de peixes de água doce são: cauda quebrada, cauda fortemente enrolada, cauda enrolada distalmente, cauda curta, cauda dobrada, gota citoplasmática proximal e distal, peça intermediária degenerada, cabeça solta, cabeça degenerada, microcefalia e macrocefalia (Costa et al., 2022). A morfologia celular é frequentemente avaliada em sêmen de peixe utilizando microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão (Cabrita et al., 2014). A avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes oferece uma ferramenta importante na identificação do rendimento reprodutivo em um plantel de reprodutores (Murgas et al., 2015).

A motilidade refere-se à capacidade funcional do espermatozoide de realizar movimentos após sua ativação. Adicionalmente, as características cinéticas podemos também abranger o simples mover-se ou podem ser distintas através das velocidades e do comportamento natatório (linearidade, retilinearidade, oscilação e balanço) (Neumann, 2019).

1.3 Análise espermática assistida por computador (CASA)

O sistema CASA foi empregado pela primeira vez em espermatozoides de mamíferos em 1974. Em peixes, publicações utilizando dados de CASA foram feitas desde 1995 (Kowalski et al., 2019). Nas últimas décadas, sistema CASA se tornou uma ferramenta popular e útil para analisar a motilidade de espermatozoides em várias espécies de peixe (Kowalski et al., 2019). Um marco importante nas avaliações espermática ocorreu em 2007, quando Wilson-Leedy e Ingermann (2007) desenvolveram um *plugin* CASA para um software livre (ImageJ; National Institutes of Health, USA) (Neumann, 2019). Para análise de qualidade espermática, a análise espermática assistida por computador (CASA) é a quantificação mais objetiva e abrangente atualmente disponível e facilita a avaliação do percentual da motilidade, das diferentes velocidades entre outros parâmetros (Wilson-Leedy & Ingermann, 2007). O uso do CASA é preferível ao uso de estimativas visuais subjetivas de motilidade porque esses sistemas fornecem medições mais confiáveis, repetíveis e objetivas do movimento dos espermatozoides (Gil et al., 2015).

O sistema CASA de análise espermática é importante e mundialmente utilizado e aceito nas avaliações de espermatozoides de peixes (Neumann, 2015). A importância do CASA foi demonstrada em estudos sobre otimização de gametas (Rurangwa et al., 2004;

Sanches et al. 2010). A avaliação objetiva da motilidade ocorre quando um software integra as sucessivas posições das cabeças dos espermatozoides em imagens consecutivas de um vídeo do movimento espermático, calculando as trajetórias e características de movimento (Figueroa et al., 2016; Neumann, 2019). O CASA estima um maior número de parâmetros cinéticos de espermatozoides, incluindo a velocidade média de deslocamento (VAP, $\mu\text{m s}^{-1}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m s}^{-1}$), velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m s}^{-1}$), progressão (PROG, %), linearidade (LIN, %), oscilação (WOB, %) e frequência de batimento cruzado (BCF, Hz) (Kowalski et al., 2019). Esses sistemas são bem adaptados às células espermáticas de peixes, que se caracterizam por um curto período de motilidade após a ativação na maioria das espécies utilizadas na aquicultura (Gil et al., 2015).

Porém, para que seja utilizado com eficiência e acurácia, há necessidade de padronização das suas configurações, as quais devem ser adaptadas para cada espécie (Neumann et al. 2013). Para operar o *plugin* CASA, é necessário que o usuário tenha conhecimento dos recursos do *software* ImageJ e realize o ajuste de 18 parâmetros para a espécie em estudo (Neumann et al., 2013). Dentre as configurações mais importantes para o sucesso da avaliação de forma computadorizada, se destacam as velocidades mínimas necessárias para considerar um espermatozoide móvel (Sanches et al., 2013). Portanto, a caracterização detalhada da qualidade seminal, integrando análises tradicionais e computadorizadas, permite uma compreensão mais ampla dos fatores que influenciam o sucesso reprodutivo em peixes (Spica, 2025). Os resultados do CASA para análise do movimento dos espermatozoides apresentam precisão confiabilidade e reprodutibilidade, fornecendo à comunidade científica uma ferramenta útil que pode ser utilizada tanto na aquicultura quanto para fins ecológicos (Gallego et al., 2018).

Apesar dos avanços no uso de sistemas computadorizados de análise seminal em peixes, ainda há uma lacuna significativa quanto à padronização dessa ferramenta para o pirarucu. A singularidade morfológica dos espermatozoides dessa espécie, especialmente a presença de dois flagelos, dificulta a definição de parâmetros cinéticos adequados, uma vez que os ajustes convencionais do CASA foram desenvolvidos majoritariamente para espécies com espermatozoides monoflagelados. A ausência de protocolos específicos limita a interpretação precisa da motilidade espermática e reforça a necessidade de estudos direcionados à calibração do sistema para *A. gigas*.

2 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem por objetivo caracterizar parâmetros espermáticos de *A. gigas* e a padronização do sistema computadorizado para avaliação da cinética espermática, visando contribuir para o aprimoramento das técnicas de avaliação reprodutiva na espécie.

2.1 Objetivos específicos

- Descrever e classificar as normalidades morfológica visíveis sob microscopia óptica, considerando as particularidades biflagelares dos espermatozoides do *A. gigas*;
- Avaliar a concentração e a integridade da membrana espermática das amostras coletadas;
- Realizar gravações de vídeos para análises da cinética espermática por meio do sistema CASA;
- Padronizar as configurações do *plugin* CASA no software ImageJ para a espécie;
- Padronizar thresholds do CASA para VSL, VAP e VCL;
- Caracterizar os parâmetros seminais de *A. gigas*: osmolaridade, volume, e a cinética espermática;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de estudo, plantel avaliado e métodos de coleta

As coletas foram conduzidas na Embrapa Pesca e Aquicultura, no município de Palmas/Tocantins/Brasil (10°08'47" S 48°18' 47" W). Estas foram realizadas entre os meses de fevereiro de 2024 a fevereiro de 2025, neste período 21 machos de *A. gigas* com massa de $38,60 \pm 11,50$ kg e um comprimento de $1,55 \pm 0,13$ m tiveram amostras coletadas. Estes animais estavam marcados com chips do tipo PIT (Passive Integrated Transponder), para possibilitar a identificação individual. Cada macho se encontrava alocado com uma fêmea em um tanque de 300m². Os animais recebiam alimentação duas vezes ao dia (manhã e tarde), sendo está feita com ração (42 % de PB) em forma de bolotas, ofertadas até a saciedade aparente. Esse projeto foi cadastrado no Sistema

Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado-SISGEN (n°ADBE614), e as coletas aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (n°82/2024).

Para cada coleta, os animais foram capturados com o auxílio de uma rede de arrasto. Após a captura e identificação individual, os peixes foram acomodados fora da água em uma estrutura acolchoada e úmida por um tempo de 10 a 15 minutos. Durante esse período de coleta, os animais foram mantidos molhados e com os olhos protegidos com um pano úmido. Durante todo processo de coleta do sêmen, houve um monitoramento do comportamento respiratório do animal, quando a cada 3 minutos o animal foi posicionado em decúbito ventral para estimular e possibilitar sua respiração. Pelo fato de o *A. gigas* ter respiração aérea obrigatória, não utilizou-se anestésicos visando assegurar uma recuperação mais rápida e segura dos animais quando devolvidos aos viveiros. Neste momento crítico, os animais foram mantidos na superfície da água até sua primeira respiração ser observada em segurança.

Para a coleta do sêmen, adotou-se o procedimento adaptado por Torati et al. (2024), que constituiu em esvaziar a bexiga urinária com auxílio de uma sonda uretral estéril (N°16) conectada a uma seringa de 20 ml, inserida através do ducto urinário até a bexiga urinária. Em seguida travou-se o canal urinário com uma sonda Foley (2 vias, 3-5 ml), sendo esta preenchida com soro fisiológico dentro da bexiga urinária (Figura 1). Com o bloqueio do canal urinário objetivou prevenir a contaminação do sêmen com a urina. Foram coletadas amostras de urina em tubos de centrífuga com fundo cônico de 15 ml estéreis (tipo Falcon). Essas amostras foram utilizadas para verificação da presença de sêmen e realização de análises de osmolaridade. Após a coleta de urina, os animais foram estimulados a liberar sêmen com uma pressão abdominal sentido crânio-caudal.



Figura 1. Sonda Foley utilizada para fazer o bloqueio do canal urinário do *A. gigas*, sendo a parte inflada posicionada dentro da bexiga urinária.

Durante o processo de coleta, as amostras de sêmen apresentaram volume reduzido, não ultrapassando 1 mL, o sêmen foi coletado utilizando seringas graduadas de 1 mL. Após coletadas, as amostras de sêmen foram mantidas em uma caixa térmica com gelo por no máximo 30 minutos pós coleta, até a realização das análises espermáticas em laboratório. Uma alíquota das amostras foi destinada para análises seminais e espermáticas de concentração espermática, índice de alterações morfológicas, índice de integridade de membrana e osmolaridade. Em seguida, o restante do material foi utilizado para capturas de vídeos para a avaliação da motilidade espermática computadorizada (CASA).

3.2 Análises seminais e espermáticas

A mensuração da concentração espermática foi realizada através da análise em câmara hermatimétrica de Neubauer. Para isso, 2 μ L de sêmen foi diluído em 500 μ L de formol salina tamponado (1:250), seguindo adaptações metodológicas baseada em Sanches et al. (2012). Após a diluição, pipetou-se uma amostra de 10 μ L através de capilaridade no campo de contagem da câmara de Neubauer. Esse processo foi feito igualmente no outro campo da câmara. Após 10 minutos de estabilização, as amostras foram analisadas em microscópio óptico (40x, ZEISS Primo Star, Alemanha).

A avaliação da porcentagem de células com membrana íntegra foi realizada utilizando-se o método de coloração eosina-nigrosina. Para isso, misturou-se 10 μ L do corante eosina (3%) com 10 μ L de nigrosina (5%). Após a homogeneização do frasco, adicionou-se 2 μ L de sêmen a essa mistura. Para realização do esfregaço, adicionou-se 10 μ L da mistura (corante/sêmen) sobre uma lâmina. Em seguida, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico (100x), câmera AxioCam MRc5 (ZEISS Primo Star,

Alemanha). Para cada macho, avaliou-se uma lâmina, onde considerou-se como células mortas aquelas que apresentaram coloração rosada (lesadas) e as vivas permaneceram brancas (íntegras).

Para análise de alterações morfológicas, 2 μL de sêmen foram fixados em 500 μL de formol salino tamponado 4,6%, contendo 5 μL de rosa de bengala (Streit et al., 2004). Após homogeneização, adicionou-se duas alíquotas de 10 μL de fixador + sêmen + corante em uma extremidade da lâmina de vidro. A lâmina foi então inclinada em um ângulo de 45° para que a gota pudesse escorrer para a outra extremidade (Sanches et al., 2016). Em seguida, as lâminas secas cobertas com lamínulas foram analisadas e fotografadas em microscópio trinocular 100x, câmera Axiocam MRc5 (ZEISS Primo Star, Alemanha).

Foram avaliadas alterações morfológicas espermáticas detectíveis em microscopia de luz, incluindo patologias de cabeça como macrocefalia, microcefalia, cabeça solta. As alterações de cauda em células biflageladas compreenderam perda de um dos flagelos, encurtamento, entrelaçamento, enrolamento, flagelos quebrados e deformações simultâneas dos flagelos.

A osmolaridade foi determinada para amostras de sêmen e urina, utilizado o osmometro Vapro 5600 (ELITechGroup, Inc. Logan, Utah. USA). Para isso, adotou-se o procedimento de calibração do equipamento antes do início das análises, a calibração foi realizada com três padrões pré-estabelecidos pela fabricante do equipamento (290 mmol/kg; 1000 mmol/kg e 100 mmol/kg). O processo de calibração foi realizado sempre antes de medir a primeira amostra. Após calibração do equipamento, analisou-se 10 μL de cada amostra.

3.3 Procedimentos de ativação espermática e gravação de vídeos

A ativação foi realizada com água destilada à temperatura ambiente (27°C), na proporção de (1:10 – sêmen: água), diluídos em um tubo tipo Eppendorf de 1,5mL. Logo após ativação, 1 μL do sêmen diluído e ativado foi adicionado em uma câmara de Neubauer espelhada (100mm de profundidade) e coberta com uma lamínula de vidro (24x24) diretamente sob a platina de um microscópio trinocular (ZEISS, Primo Star, 07745 Jena, Alemanha), previamente focado na objetiva de 20x, adaptado de Sanches et al. (2012). A captura dos vídeos foi realizada com uma câmera Basler acA640-120uc (www.baslerweb.com), conectada a um computador (processador Intel core™ i7, 16 GB

Ram, 2 TB HD, Microsoft Windows 11) por meio do *software* pylon 6.0 (www.baslerweb.com). Ao todo, foram gerados 73 vídeos a partir das amostras coletadas de seis machos. Para as análises, selecionou-se um vídeo representativo de cada macho, totalizando seis vídeos. A escolha considerou exclusivamente aqueles que apresentaram as melhores condições de visualização, incluindo contraste adequado e nitidez suficiente para permitir a identificação e seleção precisa das células. Somente os vídeos que cumpriram integralmente esses critérios de qualidade foram incluídos nas etapas seguintes da avaliação.

Em seguida, os vídeos de 60 segundos registrando a movimentação foram salvos e processados no *software* VirtualDub 1.10.4 (virtualdub.org). No programa, cada arquivo foi aberto por meio da aba *File (Open video file)* e recebeu ajustes de imagem por meio dos filtros disponíveis na aba *Video*, incluindo *Brilho/Contraste*, *Sharpen*, *Smoother* e *Threshold*. Após o tratamento dos vídeos, estes foram cortados e convertidos em sequência de imagens em intervalos sequenciais de 5 segundos (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50), as quais foram exportadas em formato .jpg para diretórios previamente definidos conforme estabelecido por Sanches et al. (2013). Em seguida, as imagens foram abertas e compiladas por meio do *software* ImageJ (<https://imagej.net/ij/>) para a aplicação do *plugin* CASA (<https://imagej.net/ij/plugins/casa.html>), conforme descrito por Wilson-Leedy & Ingermann (2007) e Sanches et al. (2010).

3.4 Configuração do CASA

As imagens foram importadas para o *software* ImageJ através dos comandos (*File, Import, Image sequence*) na sequência foram convertidas em código binário (*Image, Adjust, Threshold*). Por fim, acessou-se a caixa de diálogo *Sperm Tracker (Plugin, Analyze, CASA)*, onde foram testadas as configurações dos devidos parâmetros de análise. Para caracterização das células espermáticas quanto a mobilidade (móveis ou imóveis) foram selecionadas 50 células para cada categoria (estáticos, lentos, intermediários e rápidos), para as células estáticas e lentas foram analisadas imagens em 35 segundos pós-ativação, já as intermediárias e rápidas em 10 segundos pós-ativação. A utilização de diferentes tempos de observação teve como finalidade permitir ao *software* reconhecer adequadamente o comportamento mecânico e a velocidade real dos espermatozoides em cada classe. A fim de estabelecer uma configuração do *plugin* CASA, algumas opções foram testadas e ajustadas na caixa de diálogo (*Sperm Tracker*), como sugerido por Sanches et al. (2013).

3.5 Categorização da motilidade espermática

A conversão das coordenadas de pixel (px) para micrômetros (μm) foi realizada a partir de uma média de dez medidas (Image/Analyze/Mensure) de um retículo equivalente a $50\mu\text{m}$ da câmara de Neubauer, representando 74,6 pixels. Tal medida foi utilizada para encontrar o valor de “r” (*Microns per 1000 pixels*) na caixa de diálogo (*Sperm Tracker*). Na sequência dez células foram mensuradas, para se obter o tamanho máximo, mínimo e médio das células e foram usados para configurar os campos “a” (*Minimum Sperm size pixel*) e “b” (*Maximun sperm size pixel*). Para se obter as coordenadas de cada célula selecionada em um plano cartesiano, os parâmetros “s” (*Print xy co-ordinates for all tracked sperm*) e “t” (*Print motion characteristics for all motile sperm*), receberam o valor de “1” (Wilson-Leedy & Ingermann, 2006).

3.6 Obtenção dos dados individuais das células

No *software* ImageJ, foram selecionados 50 frames correspondentes 0,5s de vídeo, capturados em 10s pós-ativação do sêmen de cada um dos seis machos analisados. Para o estudo individual das células, realizou-se o isolamento e processamento das mesmas utilizando a sequência de comandos (Edit, Clear Outside, Yes/Image, Adjust, Threshold/Plugin, Analyze, CASA). Posteriormente, foram examinadas de forma individual, 50 células que apresentavam característica estática, 50 com baixa motilidade (lentas), 50 com movimento intermediário e 45 com alta motilidade (rápidas). Esse procedimento de isolamento possibilitou classificar as amostras em grupos distintos de motilidade.

3.7 Ajuste de parâmetros para avaliação da motilidade

Com os valores obtidos para cada célula espermática em diferentes categorias, foi possível testar 15 diferentes combinações para os seguintes parâmetros “e” (*Minimum VSL motile ($\mu\text{m.s}^{-1}$)*), “f” (*Minimum VAP motile ($\mu\text{m.s}^{-1}$)*) e “g” (*Minimum VCL motile ($\mu\text{m.s}^{-1}$)*) essenciais para a identificação das células moveis (Tabela 1).

Tabela 1. Diferentes combinações testadas para determinar a configuração dos parâmetros e, f e g na caixa de diálogo (Sperm Tracker) do CASA.

Combinações	Parâmetros		
	VSL	VAP	VCL
1	5	7	10
2	6	8	12
3	8	10	15
4	10	12	15
5	10	12	20
6	10	15	20
7	10	15	25
8	10	15	30
9	10	15	40
10	12	20	30
11	12	20	40
12	14	25	35
13	14	25	40
14	16	30	40
15	18	35	45

VCL: velocidade curvilinear; VAP: velocidade média de deslocamento; VSL: velocidade em linha reta.

3.8 Máxima velocidade entre os frames

O parâmetro “*d*” (*Maximum sperm velocity between frames pixels*) indica a máxima velocidade entre os frames foi testado e ajustado, pois valores baixos podem excluir as células rápidas e valores altos podem reconhecer células vizinhas. Com isso, o parâmetro “*d*” foi testado com os seguintes valores: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16. A configuração foi testada para os seis vídeos, um de cada macho, a partir dos 10s pós-ativação.

3.9 Análise comparativa das trajetórias espermáticas

Para identificar as células imóveis, as moveis e aquelas que entraram ou saíram do campo de visualização e as que não foram consideradas pelo sistema CASA, foi realizada uma avaliação visual em um vídeo de um único macho. As análises foram realizadas em 10s e 35s pós-ativação com avaliação de 25 e 100 frames respectivamente. Portanto, as trajetórias geradas pelo CASA/ImageJ foram comparadas com a imagem gerada da soma de todas as imagens importadas no ImageJ (Image/Stacks/ZProject/Projection Type: min intensity) (Sanches et al.,2013).

3.10 Dinâmica espermática ao longo do tempo pós-ativação

Após configuração do CASA, os dados obtidos foram enviados e abertos no software Microsoft Office Excel®, salvas como pasta de trabalho do Excel (*.xlsx). Posteriormente, os parâmetros do sêmen analisados pelo CASA entre 10s à 50s pós-ativação foram os seguintes: taxa de motilidade (MOT), velocidade curvilinear (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR), oscilação (WOB), progressão (PROG) e frequência de batimento transposto (BCF). A linearidade (LIN) foi obtida através do cálculo ($LIN = VSL/VCL$).

3.11 Análise estatística

Foram conduzidas análises estatísticas descritivas englobando os parâmetros concentração, integridade da membrana, morfologia espermática, osmolaridade e as variáveis cinéticas MOT, VCL, VAP, VSL, STR, WOB, PROG, BCF e LIN. Além disso, os espermatozoides agrupados conforme suas categorias de motilidade foram também analisados de forma descritiva.

Para determinação de cada velocidade foi realizado uma análise exploratória multivariada de cluster, utilizando agrupamento de árvore (*tree clustering*) pelo método de Ward. Posteriormente foi realizado uma análise de agrupamento k-means (*k-means clustering*). Os agrupamentos foram submetidos ao teste de variância (ANOVA) a 5% de significância.

A taxa de motilidade (MOT) em função das dez combinações testadas foi submetida a uma análise de variância de efeitos principais (*main effects-ANOVA*) à um nível de significância de 5 % ($p < 0,05$). A validação do parâmetro “d” do *plugin* CASA foi conduzida mediante análise de regressão segmentada, associada à aplicação de um teste de platô, considerando os valores compreendidos de 4 a 16, definidos na caixa de diálogo do *software*. As análises foram realizadas no *software* Statistica 7.0 Statsoft®.

4 RESULTADOS

4.1 Aspecto técnico da caracterização

Neste estudo, a coleta de amostras de sêmen do pirarucu apresentou desafios significativos, desafios atribuídos à dificuldade quanto a manipulação dos animais, baixo volume de sêmen, amostras contaminadas por urina e a presença de cistos espermáticos em todas as amostras coletadas. Apesar dos esforços metodológicos adotados, foi possível

analisar 6 amostras dos 21 animais coletados, correspondendo a uma efetividade de 28,6%.

Durante a análise microscópica do sêmen recém coletado, foram observadas estruturas compatíveis com cistos espermáticos não rompidos. Esses cistos, visíveis ao microscópio como estruturas esféricas ou ovais envoltas por uma membrana intacta, continham em seu interior células espermáticas, muitas das quais apresentavam movimento ativo. As amostras apresentaram-se inicialmente inativas e foram ativadas com água destilada. O período mínimo de movimentação celular registrado foi de 40 segundos, enquanto o tempo médio foi de 46,5 segundos, alcançando um máximo de 52 segundos.

Para configuração do CASA, a parte essencial do processo é a gravação de boas imagens e posteriormente sua edição. A obtenção de imagens de boa qualidade foi frequentemente comprometida pela presença de “cistos espermáticos” (Figura 2), observados em todas as amostras. Essa limitação ocorre porque o *software* utilizado, não reconhece adequadamente as células quando ocorre uma colisão com outra célula ou aqui neste caso com os cistos.

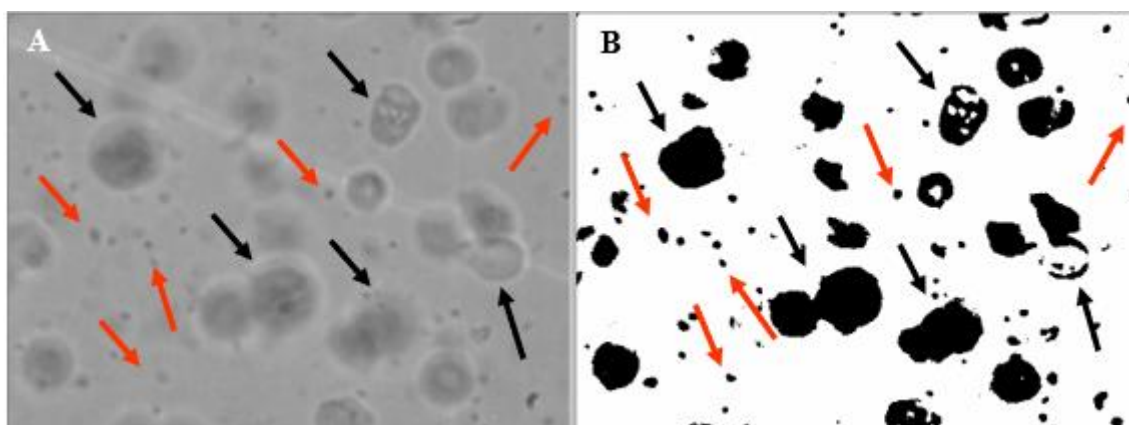


Figura 2. Imagem demonstrando a presença dos “cistos” espermáticos no sêmen do pirarucu. A: vídeo original B: vídeo editado no VirtualDub. Setas pretas indicam os cistos e as vermelhas destacam células espermáticas.

4.2 Análise de cluster

A análise de clusters produziu quatro clusters. Dados da VCL, VAP e VSL obtidos de 1.082 células espermáticas avaliadas individualmente foram submetidos à análise explanatória multivariada de cluster, para isso, utilizou-se inicialmente análise de

agrupamento de árvore (*tree clustering*) pelo método de Ward com distância euclidiana (Figura 3). Evidenciando o número de clusters por meio da maior distância entre os clusters (8.366) realizou-se posteriormente análise de agrupamento k-means (*k-means clustering*), na qual foi possível identificar as médias, seguindo da análise de variância dos clusters definidos a partir de todas as células espermáticas analisadas (Figura 3).

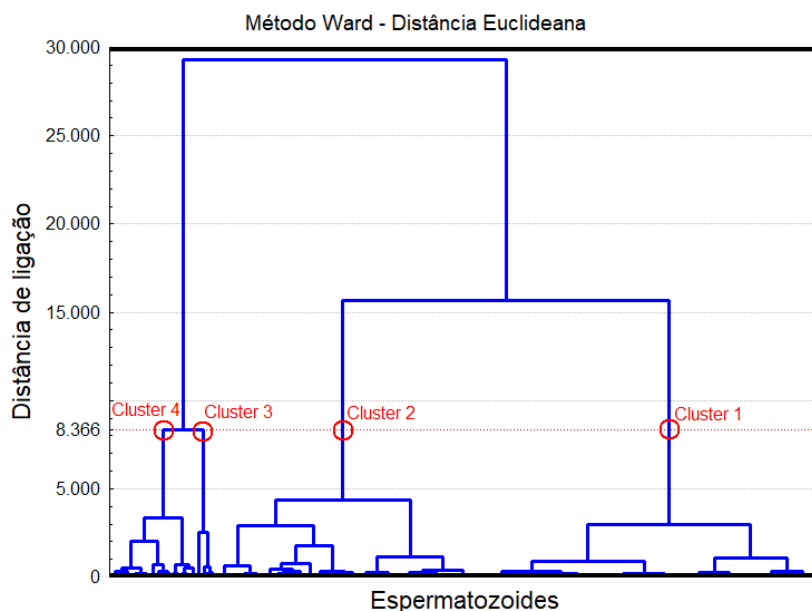


Figura 3. Dendrograma da distância Euclidiana, a partir das variáveis analisadas do sêmen fresco do *A. gigas*.

A análise de cluster permitiu classificar os espermatozoides em quatro grupos distintos de motilidade. O cluster 1 foi caracterizado por espermatozoides com baixa velocidade e vigor reduzido ($n= 726$, 67,10 % das amostras), o cluster 2 apresentou células com motilidade limitada e deslocamento pouco expressivo ($n=271$, 25,05 % das amostras), o cluster 3 agrupou espermatozoides com padrão de movimentação intermediária ($n= 74$, 6,83 % das amostras), e o cluster 4 reuniu células rápidas, com trajetória linear e batimento flagelar vigoroso ($n= 11$, 1,02 % das amostras). O teste de ANOVA revelou diferença altamente significativa entre os clusters para VCL, VAP e VCL ($P<0,01$), confirmando a heterogeneidade da amostra (Tabela 2). A distribuição dos espermatozoides entre os diferentes agrupamentos variou significativamente conforme o tempo decorrido após a ativação.

Tabela 2. Caracterização dos clusters com base em parâmetros de motilidade espermática.

Variáveis	Clusters				Anova: F e p-valor
	1	2	3	4	
VCL ($\mu\text{m/s}$)	41,06 $\pm$ 19,62	131,19 $\pm$ 37,60	236,62 $\pm$ 59,16	394,00 $\pm$ 61,54	$F_{(3,1078)}=1.773,47$; $p<0,01$
VAP ($\mu\text{m/s}$)	11,01 $\pm$ 9,37	30,97 $\pm$ 20,49	102,97 $\pm$ 56,83	370,47 $\pm$ 69,00	$F_{(3,1078)}=1.493,69$; $p<0,01$
VSL ($\mu\text{m/s}$)	8,66 $\pm$ 8,77	23,71 $\pm$ 20,13	92,54 $\pm$ 56,91	355,84 $\pm$ 68,16	$F_{(3,1078)}=1.383,62$; $p<0,01$
n	726	271	74	11	

VCL: velocidade curvilinear; VAP: velocidade média de deslocamento; VSL: velocidade em linha reta; n: número de células.

4.3 Classificação do movimento espermático

A aplicação da análise de clusters permitiu identificar padrões distintos de motilidade espermática em *A. gigas*, categorizadas em quatro grupos: as estáticas foram as que apresentaram velocidade curvilinear inferior a $41 \mu\text{m.s}^{-1}$, lentas ficaram entre $41 \mu\text{m.s}^{-1}$ e $131 \mu\text{m.s}^{-1}$, intermediárias de $131 \mu\text{m.s}^{-1}$ e $237 \mu\text{m.s}^{-1}$, já as rápidas foram as superiores a $238 \mu\text{m.s}^{-1}$. Essa classificação contribuiu para um ajuste mais preciso das configurações do sistema CASA, possibilitando a definição de limites mais claros para a identificação de células com baixa ou alta motilidade. A partir da análise dos clusters, foi realizada uma análise descritiva que permitiu identificar a média de todos os parâmetros (Tabela 3).

Tabela 3. Estatística descritiva de espermatozoides de *A. gigas* para a identificação de células estáticas, lentas, intermediárias e rápidas. Avaliação após 0,5s (50 pixels).

Classificação	Parâmetros	n	Média	Mediana	Min	Max	D.P.	E.P.
Estáticos	VCL ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	50	27,25	26,56	15,08	57,5	8,92	1,26
	VAP ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	50	12,30	9,92	3,06	30,14	7,21	1,02
	VSL ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	50	10,32	7,52	1,02	29,37	7,59	1,07
	STR (%)	50	77,04	85,05	29,16	97,78	19,94	0,28
	WOB (%)	50	46,05	44,08	7,28	97,71	21,60	0,30
	LIN (%)	50	38,30	34,61	2,43	93,63	23,55	3,33
Lentos	VCL ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	50	74,29	69,3	42,58	131,11	25,38	3,59
	VAP ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	50	32,15	27,59	6,80	106,63	19,94	2,82
	VSL ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	50	26,34	23,16	2,52	97,73	19,77	2,79
	STR (%)	50	78,40	87,81	28,58	96,45	19,08	0,27
	WOB (%)	50	45,24	47,52	0,64	1,01	23,01	0,32
	LIN (%)	50	37,74	39,03	3,5	97,41	23,45	3,32
Intermediários	VCL ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	50	173,27	168,22	133,01	234,36	27,05	3,82
	VAP ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	50	76,80	71,93	18,54	176,88	41,27	5,83
	VSL ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	50	67,30	58,95	13,66	165,84	41,75	5,9
	STR (%)	50	84,82	91,64	37,85	97,19	13,97	0,19
	WOB (%)	50	45,32	40,54	0,81	1,00	25,49	0,36
	LIN (%)	50	39,4	32,55	1,00	96,58	26,00	3,68
Rápidos	VCL ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	45	340,91	304,85	235,08	794,55	102,43	15,27
	VAP ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	45	209,03	189,66	22,02	774,73	171,04	25,50
	VSL ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	45	192,85	137,73	7,00	748,32	169,39	25,25
	STR (%)	45	84,89	94,56	31,81	97,97	18,16	0,27

WOB (%)	45	56,19	59,5	0,64	1,06	34,44	0,51
LIN (%)	45	51,46	39,7	2,02	104,6	34,81	5,19

VCL: velocidade curvilínea; VAP: velocidade média de deslocamento; VSL: velocidade em linha reta;

STR: retilinearidade; WOB: oscilação; LIN: linearidade; D. P.: desvio padrão; E.R.: erro padrão; n: número de células avaliadas.

A análise cinética realizada pelo sistema CASA permitiu distinguir padrões raros de movimentação espermática entre as categorias estáticos, lentos, intermediários e rápidos. Embora classificados como estáticos, esses espermatozoides apresentaram valores residuais de VCL ($27,25 \mu\text{m.s}^{-1}$), atribuídos à detecção de ruídos e micro-oscilação da cabeça pelo *software*. Esses espermatozoides exibiram baixíssima progressividade, com VSL de $10,32 \mu\text{m.s}^{-1}$, baixa linearidade LIN (38, 30%) e valores moderados de STR (77,04%) e WOB (46,05%), indicando apenas movimento microscópicos sem deslocamento efetivo. Funcionalmente esse padrão caracteriza células metabolicamente inativas, com contribuições desprezíveis para a fertilização.

Os espermatozoides classificados como letos apresentaram VCL de $74,29 \mu\text{m.s}^{-1}$ e VSL de $26,34 \mu\text{m.s}^{-1}$, refletindo moderada velocidade e progressividade. A linearidade foi reduzida LIN (37,74%), sugerindo trajetórias curvilíneas ou oscilatórias, enquanto o STR relativamente elevado (78,40%) indicou coerência direcional moderada, porém com deslocamento pouco eficiente. Esse conjunto de parâmetros caracteriza um padrão funcional lento e curvilíneo, com limitada capacidade de progressão.

Na categoria intermediária, observaram-se valores cinéticos mais elevados em um padrão de movimento distinto. O VCL atingiu $173,27 \mu\text{m.s}^{-1}$, associado a moderada linearidade LIN (67,30%) e alta STR (84,82%), além de WOB em torno de 56,19%. Essa combinação de alta velocidade curvilínea com boa orientação ao VAP caracteriza um padrão progressivo-curvilíneo, compatível com a dinâmica esperada para espermatozoides biflagelados, nos quais a dupla propulsão favorece trajetórias vigorosas, porém não retilíneas.

Os espermatozoides rápidos apresentaram os dois valores cinéticos, com VCL de $340,91 \mu\text{m.s}^{-1}$ e VSL de $192,85 \mu\text{m.s}^{-1}$, indicando elevada velocidade e progressividade. Esses espermatozoides exibiram maior linearidade 51,46%, elevada STR (84,89%) e WOB (56,19%), sugerindo ampla oscilação lateral associada a forte propulsão. Esse padrão reflete um comportamento rápido, progressivo e relativamente linear, sendo funcionalmente o mais eficiente e potencialmente associado à maior capacidade fertilizante.

De forma integrada, os resultados demonstram que a cinética espermática do pirarucu não pode ser interpretada apenas com base na velocidade absoluta. A combinação dos parâmetros LIN, STR e WOB revela comportamentos de nado distintos entre as categorias evidenciando que espermatozoides rápidos apresentam alta progressividade e orientação direcional, enquanto os intermediários exibem movimento vigoroso com trajetória curvilínea, típico de espécies com espermatozoides biflagelados. Já os lentos e estáticos apresentam deslocamento limitados ou inexistente.

4.4 Combinações de velocidades mínimas

Nos ensaios realizados com diferentes combinações dos parâmetros VSL, VAP e VCL, observou-se que houve efeito ($p < 0,01$) entre as condições testadas. Verificou-se redução na taxa de motilidade à medida que se empregava valores mais elevados desses parâmetros. Considerando esse comportamento, a configuração denominada “9” $VSL=10 \mu m s^{-1}$; $VAP=15 \mu m s^{-1}$ e $VCL=40 \mu m s^{-1}$, foi selecionada por oferecer melhor desempenho (Figura 4).

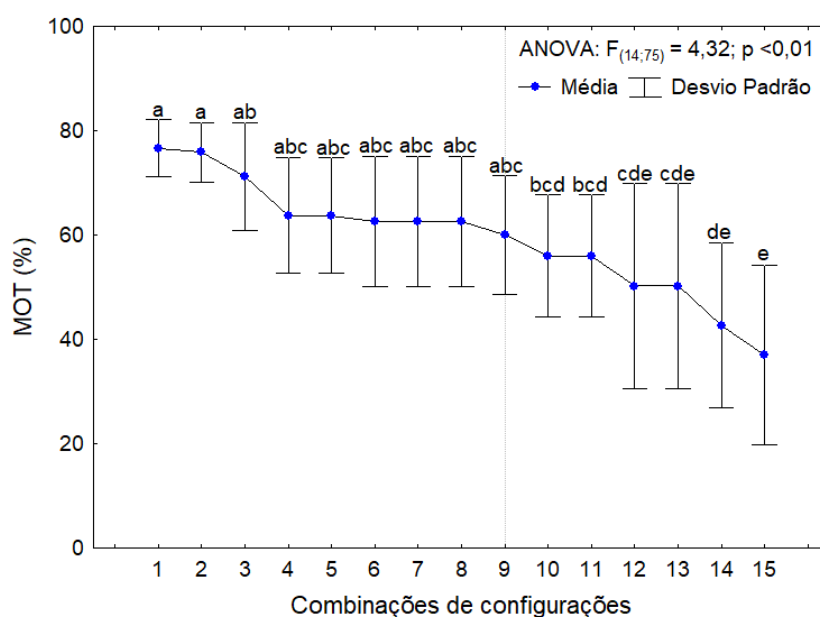


Figura 4. Resultado da taxa de motilidade (%) e a velocidade média de deslocamento (VAP) de espermatozoides de *A. gigas* analisados com 1s (100 frames) avaliados após 10s de ativação. As diferentes combinações testadas para considerar o espermatozoide como móvel foram: **1)** $VSL=5$, $VAP=7$, $VCL=10$; **2)** $VSL=6$, $VAP=8$, $VCL=12$; **3)** $VSL=8$, $VAP=10$, $VCL=15$; **4)** $VSL=10$, $VAP=12$, $VCL=15$; **5)** $VSL=10$, $VAP=12$, $VCL=20$; **6)** $VSL=10$, $VAP=15$, $VCL=20$; **7)** $VSL=10$, $VAP=15$, $VCL=25$; **8)** $VSL=10$, $VAP=15$, $VCL=30$; **9)** $VSL=10$, $VAP=15$, $VCL=40$; **10)** $VSL=12$, $VAP=20$, $VCL=30$;

11) VSL=12, VAP=20, VCL=40; 12) VSL=14, VAP=25, VCL=35; 13) VSL=14, VAP=25, VCL=40; 14) VSL=16, VAP=30, VCL=40; 15) VSL=18, VAP=35, VCL=45.

4.5 Máxima velocidades entre frames

Na análise do parâmetro “d” (*Maximum speed velocity between frames (pixels)*), observou-se que o aumento da velocidade entre frames resultou em crescimento linear até atingir um ponto de platô, a partir do qual não ocorreram ganhos significativos. Esse comportamento foi confirmado pelo teste de *breakpoint* ($p < 0,05$), indicando o ponto de ruptura para MOT em 9,48 (Figura 5). A partir dessa avaliação, adotando uma margem segura para as avaliações definiu-se o valor 12 como o mais adequado para o reconhecimento automático das células, garantindo maior precisão no sistema de análise.

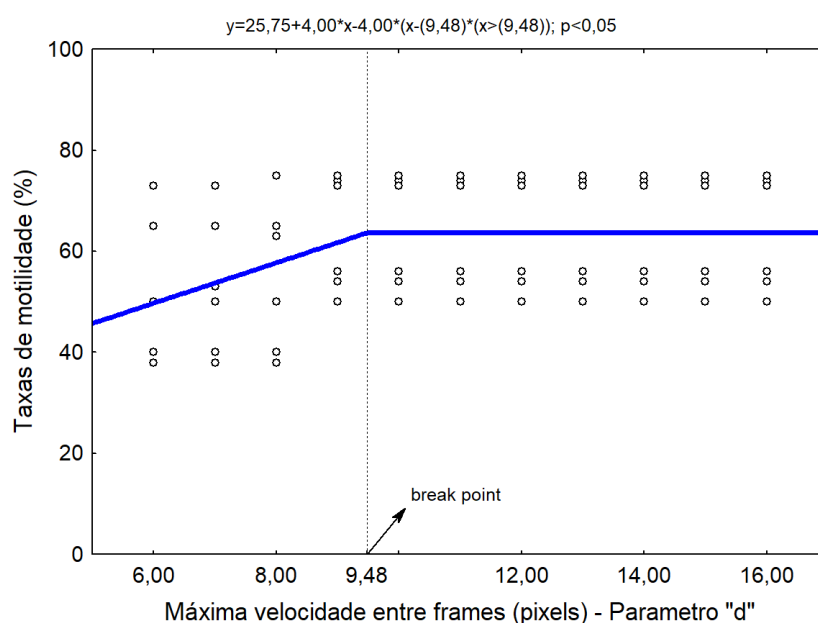
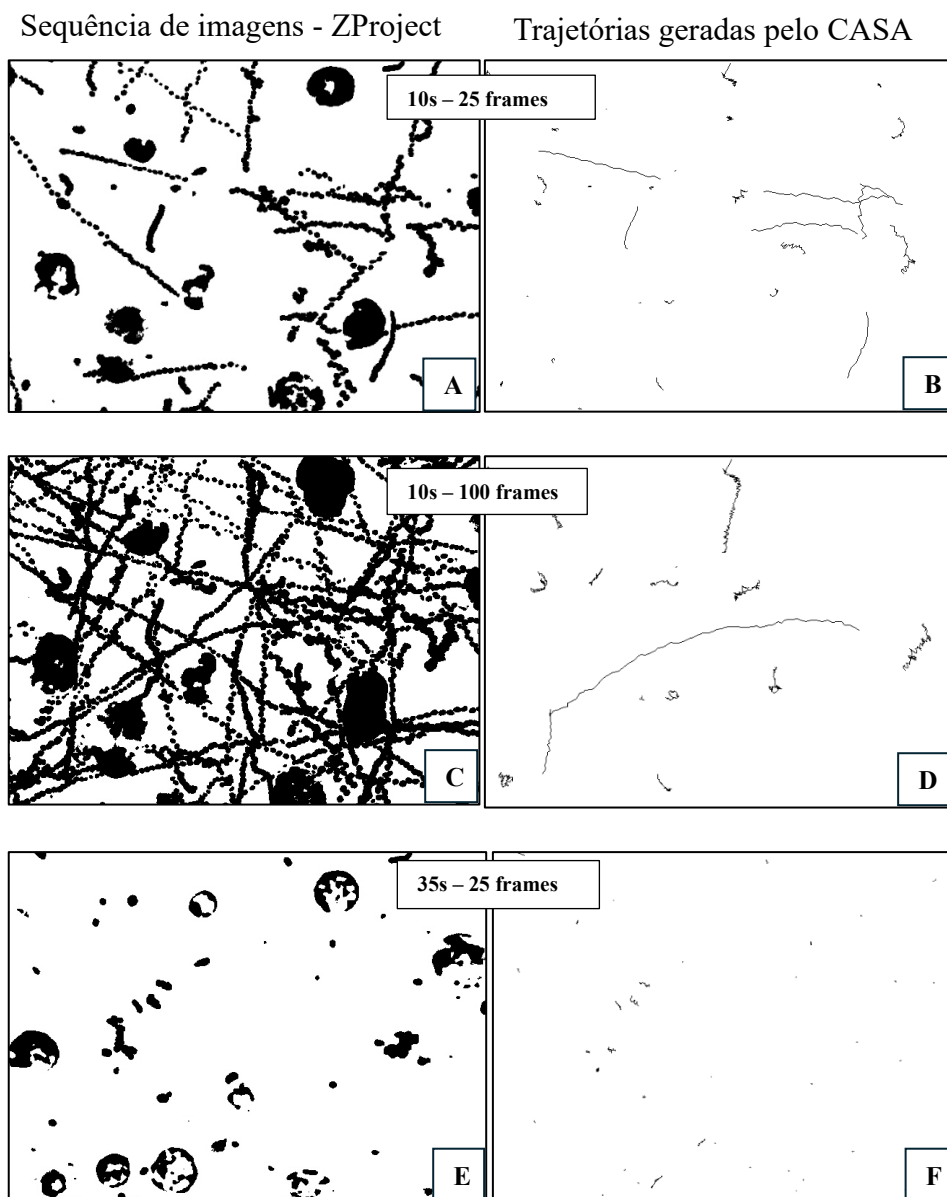


Figura 5. Valores testados para o parâmetro d (máxima velocidade entre frames - pixels) para seis machos 10 segundos pós-ativação, com avaliação de 50 frames.

4.6 Comparação das trajetórias dos espermatozoides

A partir das configurações previamente definidas, foi possível realizar uma análise detalhada utilizando o sistema CASA, com o objetivo de comparar as trajetórias geradas pelo *plugin* com os deslocamentos reais observados nas células espermáticas. Essa avaliação foi conduzida em dois intervalos temporais distintos entre 10 e 35 segundos, correspondentes a 25 e 100 quadros, respectivamente (Figura 6). Essa etapa foi essencial para verificar a precisão do sistema automatizado na identificação dos movimentos

celulares. A análise permitiu observar se o *software* conseguia acompanhar corretamente as trajetórias reais, incluindo situações em que as células entravam ou saíam do campo de visão, bem como aquelas que colidiam entre si. Esse tipo de avaliação é fundamental para assegurar que o sistema CASA esteja capturando com fidelidade os padrões de deslocamento, evitando interpretações equivocadas que possam comprometer os resultados da motilidade espermática.



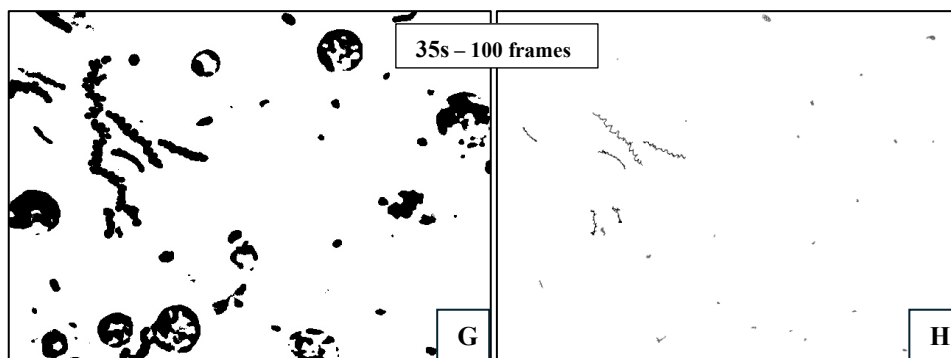


Figura 6. Comparação de imagens das trajetórias espermáticas geradas e importadas do software ImageJ/ZProject (esquerda), imagens importadas do *plugin* CASA (direita). Comparações realizadas 10s pós-ativação para 25 frames (0,25s) (A e B) e para 100 frames (1s) (C e D). Comparações realizadas a 35s pós-ativação para 25 frames (E e F) e para 100 frames (G e H).

4.7 Ajustes dos parâmetros do CASA

Com os principais parâmetros ajustados, foi possível estabelecer uma configuração específica para a análise espermática do pirarucu utilizando o sistema livre CASA. Os valores adicionados a caixa de diálogo (*Sperm Tracker*) CASA/ImageJ estão expressos na Tabela 4. Essa configuração representa um modelo otimizado para o reconhecimento e acompanhamento das trajetórias celulares, contribuindo para a padronização das análises e a reprodutibilidade dos resultados.

Tabela 4. Configurações usadas na caixa de diálogo do CASA (*Sperm Tracker*), para caracterização de parâmetros espermáticos do *A. gigas*, com vídeos gravados em objetiva de 20x a 100 frames por segundo (fps). Configuração utilizada para avaliação de 0,5s de vídeo ou 50 frames.

Parâmetros entrada	Valores entrada
<i>a. Minimum sperm size (pixels):</i>	5
<i>b. Maximum sperm size (pixels):</i>	200
<i>c. Minimum track length (frames):</i>	50
<i>d. Maximum sperm velocity between frames (pixel):</i>	12
<i>e. Minimum VSL for motile ($\mu\text{m/s}$):</i>	10
<i>f. Minimum VAL for motile ($\mu\text{m/s}$):</i>	15
<i>g. Minimum VCL for motile ($\mu\text{m/s}$):</i>	40
<i>h. Low VAP speed ($\mu\text{m/s}$):</i>	5
<i>i. Minimum percentage of path with zero VAP:</i>	1
<i>j. Maximum percentage of path with zero VAP:</i>	10
<i>k. Low VAP speed 2 ($\mu\text{m/s}$):</i>	10
<i>l. Low VCL speed ($\mu\text{m/s}$):</i>	15
<i>m. High WOB (percent VAP/VCL):</i>	80
<i>n. High LIN (percent VSL/VAP):</i>	80
<i>o. High WOB two (percent VAP/VCL):</i>	50
<i>p. High LIN two (percent VCL/VAP):</i>	60
<i>q. Frame rate (frames per second):</i>	100
<i>r. Microns per 1000 pixels:</i>	670.2*
<i>s. Print xy co-ordinates for all tracked sperm?</i>	0
<i>t. Print motion characteristics for all motile sperm?</i>	0
<i>u. Print median values for motion characteristics?</i>	0

*Valor obtido para calibração a partir da mensuração de um retículo da câmara de Neubauer (50 μm =74.6pixels).

4.8 Representação dos padrões de motilidade

Após a definição das configurações ideais, foi possível realizar a análise em 50 frames (0,5s) em um vídeo capturado 25s pós-ativação dos espermatozoides. Nesse intervalo, foram isoladas quatro células espermáticas do pirarucu, representando cada uma das categorias de motilidade (estática, lenta, intermediária e rápida) (Figura 7). A partir dessa segmentação, foi possível identificar com precisão os pontos utilizados pelo sistema para o cálculo dos principais parâmetros (VCL, VAP, VSL), permitindo uma compreensão mais aprofundada da dinâmica de movimentação celular e da eficácia na caracterização dos diferentes padrões de deslocamento.

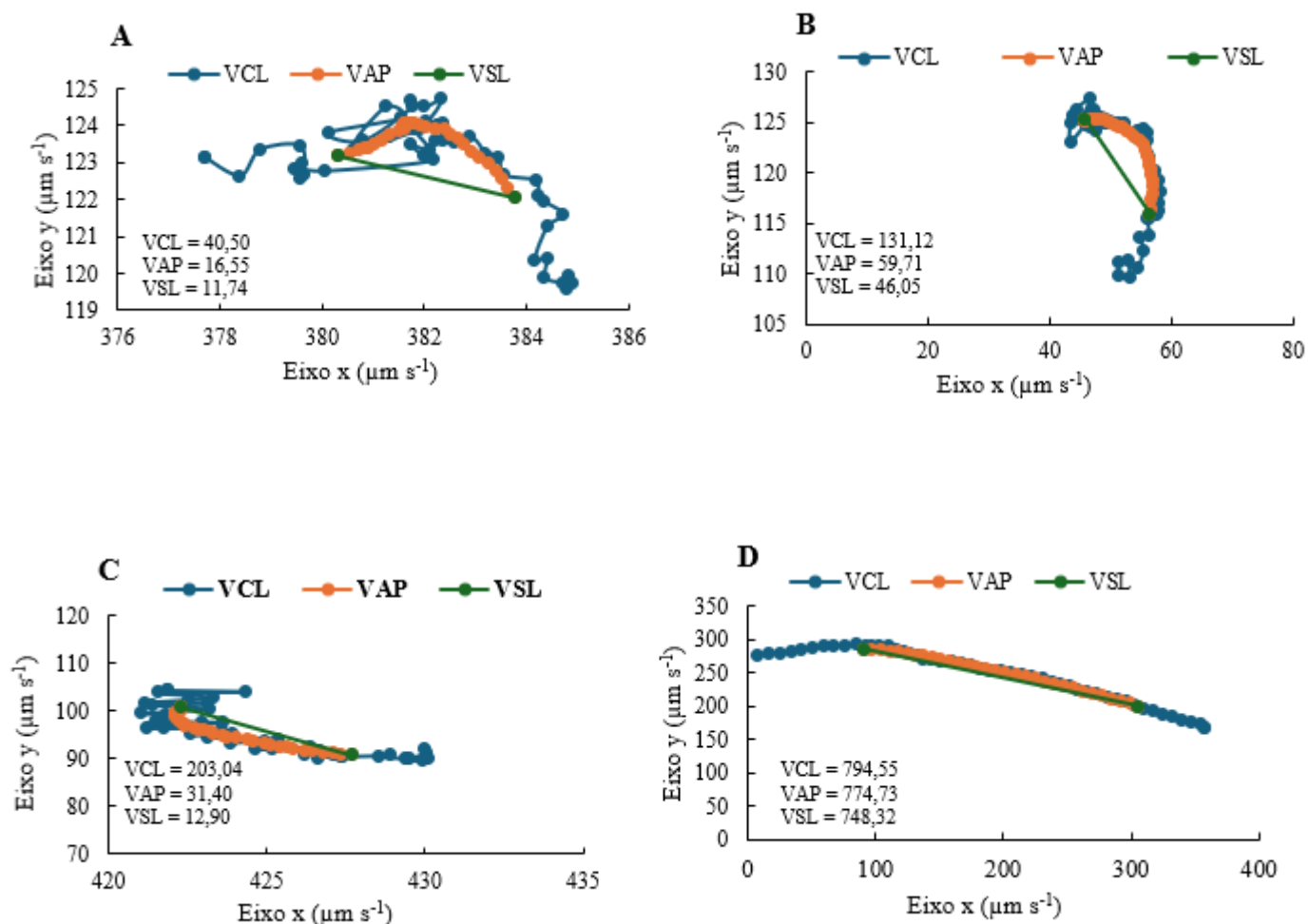


Figura 7. Imagem da trajetória obtida no CASA com quatro células espermáticas de *A. gigas* isoladas e sua classificação de acordo com seus respectivos valores para velocidade curvilinear (VCL), média de deslocamento (VAP), velocidade em linha reta (VSL): A) estática; B) lenta; C) intermediária e D) rápida.

4.9 Caracterização seminal, morfológica e cinética

Neste estudo, foram inicialmente coletadas amostras de sêmen de 21 machos de *A. gigas*. No entanto, devido a limitação durante o processo de coleta e à ausência de características reprodutivas ideais em alguns indivíduos, apenas uma parte dessas amostras pôde ser efetivamente analisada. Das amostras viáveis, onze apresentaram concentração média de $5,63 \pm 1,06 \times 10^{10}$ espermatozoides ml^{-1} . Para a avaliação da integridade da membrana plasmática, foram utilizadas amostras de dez machos, totalizando 7.665 células analisadas (Figura 8). Onde a integridade média foi $59,1 \pm 10,90$ de células íntegras (Tabela 5). Já para a definição dos parâmetros no sistema CASA, foram utilizados seis vídeos provenientes de diferentes amostras, cada um representando um

macho distinto. A partir da análise dessas gravações, foi possível estabelecer uma configuração adequada para a caracterização dos parâmetros espermáticos da espécie, considerando o intervalo de 10 segundos pós-ativação (Tabela 5).

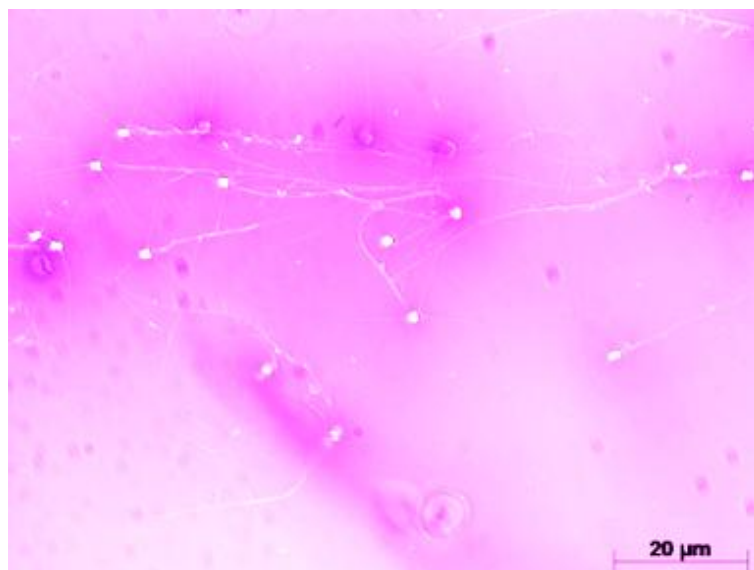


Figura 8. Células espermáticas de *A. gigas* expostas a análise de integridade da membrana, onde as células intactas apresentaram a coloração branca.

Tabela 5. Parâmetros seminais de *A. gigas* utilizados para avaliação espermática.

Parâmetros	n	Média	Mínimo	máximo	D.P	E. P
Concentração (spz.ml ⁻¹)	11	5,63 x 10 ⁹	2,00 x 10 ⁸	3,74 x 10 ¹⁰	1,06 x 10 ¹⁰	3,21 x 10 ⁹
Integridade (%)	10	59,10	45,00	74,10	10,90	3,40
MOT (%)	6	58,43	44,44	75,00	12,92	5,27
VCL (μm.s ⁻¹)	6	119,20	58,90	117,19	51,05	20,84
VAP (μm.s ⁻¹)	6	76,80	30,01	158,75	46,31	18,91
VSL (μm.s ⁻¹)	6	69,16	24,52	145,48	42,87	17,50
STR (%)	6	89,08	81,69	92,32	0,34	1,60
WOB (%)	6	62,13	49,23	90,82	15,18	6,20
PROG (μm)	6	1112,82	442,24	2323,32	676,84	276,32
BCF (Hz)	6	25,22	11,96	35,71	8,20	3,35
NSPZ	6	15	9	22	4,77	1,95

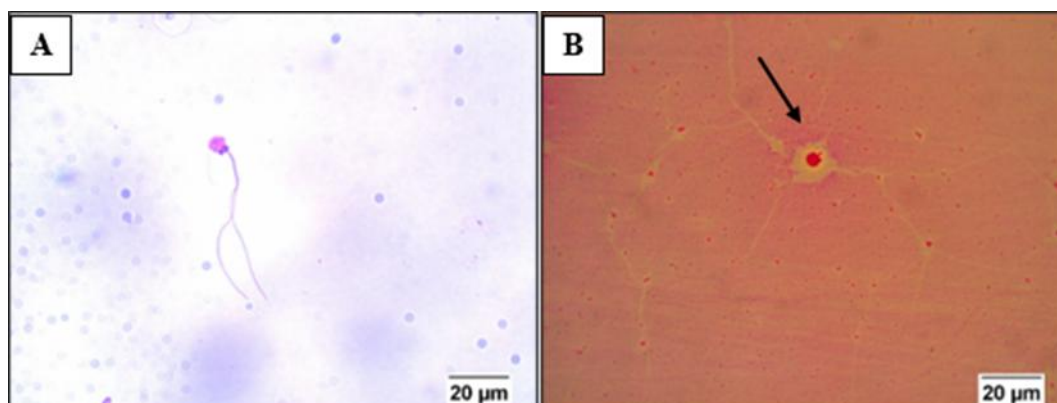
Concentração: Concentração espermática estimada em espermatozoides por mililitro. Integridade: Percentual de células com membrana íntegra. spz: Espermatozoides. n: Número de animais amostrado. D. P: Desvio padrão. E. P: Erro padrão. MOT: taxa motilidade. VCL: velocidade curvilinear. VAP: velocidade média de deslocamento. VSL: velocidade em linha reta. STR: retilinearidade. WOB: oscilação. PROG: progressão. BCF: frequência de batimento transposto. NSPZ: número de espermatozoides avaliados no CASA.

A Tabela 6 apresenta a estática descritiva da morfologia espermática do pirarucu, baseada na análise de células biflageladas. Observou-se que a média de espermatozoides com morfologia normal foi de $48,9 \pm 15,4\%$, indicando elevada variabilidade morfológica entre os indivíduos avaliados. Entre as alterações identificadas, o flagelo quebrado foi a anomalia mais frequente $17,70 \pm 11,20\%$, sugerindo comprometimento estrutural da cauda, enquanto o flagelo enrolado apresentou ocorrência mínima $0,10 \pm 0,40\%$. Ao todo, foram analisadas 5,520 células espermáticas, conforme ilustrado na Figura 9, o que confere robustez à caracterização morfológica realizada.

Tabela 6. Análise da normalidade morfológicas dos espermatozoides do *A. gigas*.

Estatística descritiva	Morfologia (%)								
	N	FQ	AFD	CS	FC	FE	Micro.	AF	F enr.
Número de amostras	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Média	48,90	17,70	11,60	9,80	8,00	3,00	0,60	0,30	0,10
Mediana	57,00	14,00	10,90	8,80	7,30	1,80	0,20	0,00	0,00
Mínimo	19,50	4,10	4,40	4,60	3,70	0,00	0,00	0,00	0,00
Máximo	74,00	32,80	19,50	23,20	19,70	9,50	3,40	1,10	1,40
Erro padrão	4,60	4,10	1,30	1,70	1,40	0,90	0,30	0,10	0,10
Desvio padrão	15,40	11,20	4,20	5,50	4,60	3,00	1,00	0,40	0,40

N: Flagelo normal; FQ: Flagelo quebrado; AFD: Ambos os flagelos deformados; CS: Cabeça solta; FC: Flagelo curto; FE: Flagelo enrolado; Micro: Microcefalia; AF: Ausência de um flagelo; F enr.: Flagelo entrelaçados.



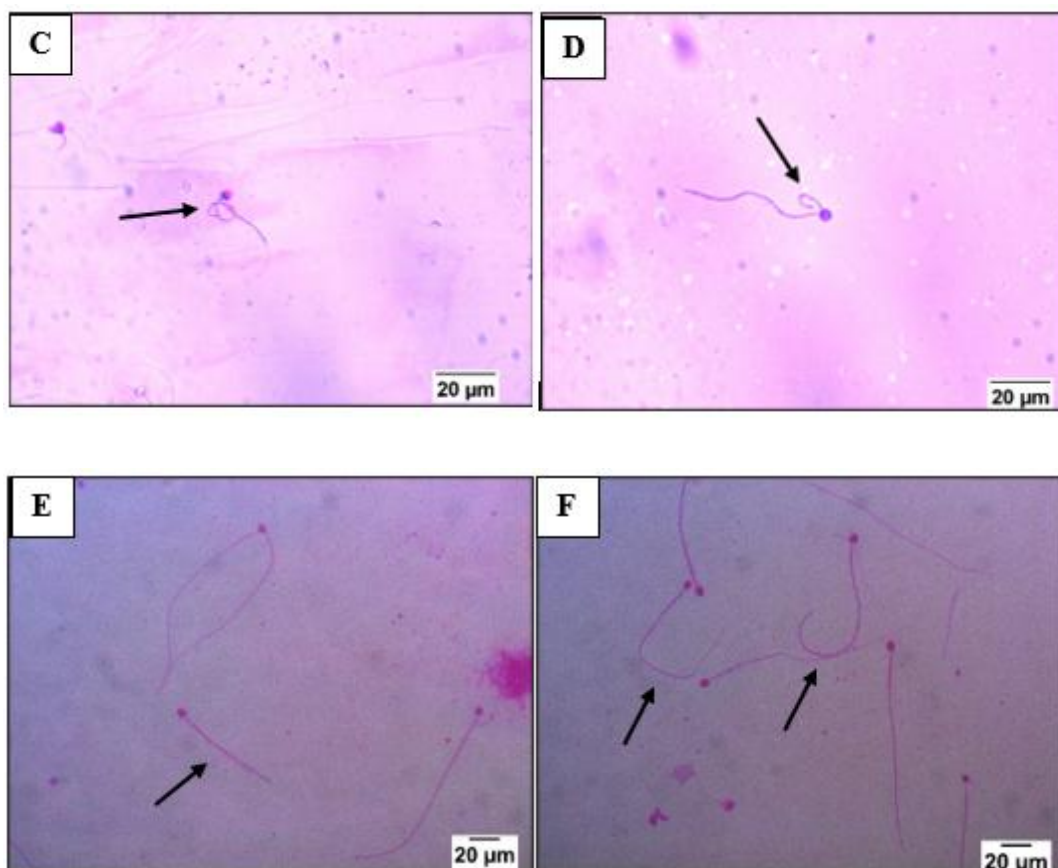


Figura 9. Imagens de morfologia ótica (100x) de células espermáticas de *A. gigas*. A: Flagelo duplo normal; B: Cabeça solta; C: Flagelo enrolado; D: Ausência de um flagelo; E: Flagelo encurtado; F: Flagelo quebrado.

Para a osmolaridade passaram por análises amostras de sêmen e urina de sete machos. Onde o valor médio encontrado para o sêmen foi de $(302,70 \pm 104,30 \text{ mOsm/kg})$ e $(98,80 \pm 48,70 \text{ mOsm/kg})$ para urina (Tabela 7).

Tabela 7. Parâmetros de osmolaridade para amostra de sêmen e urina do *A. gigas*.

Parâmetros	Osmolaridade (mOsm/kg)	
	Sêmen	Urina
Número de amostras	7	7
Média	302,70	98,80
Mediana	278,00	86,00
Mínimo	134,00	31,00
Máximo	442,00	180,70
Erro padrão	39,40	18,40
Desvio padrão	104,30	48,70

mOsm/kg=miliosmóis por quilogramas.

5 DISCUSSÃO

Este estudo apresenta, pela primeira vez, uma caracterização detalhada dos parâmetros espermáticos do pirarucu, constituindo até o momento a única abordagem sistematizada voltada à análise cinética e funcional dos espermatozoides dessa espécie. A ausência de informações prévias sobre a dinâmica espermática do *A. gigas* reforça o caráter pioneiro deste trabalho e amplia sua relevância científica, especialmente diante das particularidades morfológicas da espécie, como a presença de espermatozoides biflagelados, que demandam critérios específicos de avaliação.

A identificação de cistos espermáticos neste estudo contribui para a ampliação do conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva do pirarucu, espécie emblemática da ictiofauna amazônica e de elevado interesse para a aquicultura, oferecendo subsídio relevante para o entendimento de seu processo reprodutivo. Ao investigar detalhadamente os parâmetros espermáticos e relatar a ocorrência de estruturas pouco descritas, o estudo amplia a compreensão sobre os mecanismos envolvendo a biologia reprodutiva dessa espécie. De certa forma, a padronização dos critérios da qualidade seminal do pirarucu favorece uma seleção mais objetiva de reprodutores com maior potencial fertilizante. A padronização de tais parâmetros é fundamental para otimizar as taxas de fertilização e promover o uso racional de reprodutores (Sanches et al., 2011). Além disso, embora a fertilização artificial da espécie ainda não seja viável, os dados obtidos podem auxiliar no desenvolvimento de protocolos de criopreservação e estudos ecológicos com espermatozoides biflagelados.

O estudo da biologia reprodutiva e a caracterização espermática de espécies nativas da América do Sul são importantes para o controle da reprodução em cativeiro, pois a qualidade do esperma afeta diretamente a fertilização bem-sucedida (Mishu et al. 2020; Costa, et al. 2022). A qualidade do sêmen apesar de sua importância, é um dos fatores que limita o sucesso reprodutivo. As amostras de sêmen coletadas neste estudo apresentaram um volume relativamente baixo na maioria das amostras (< 1 mL). Em estudo com o jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) Borges et al. (2020) relatam ter encontrado amostras com coloração branca, baixa viscosidade e pequeno volume 0,3 a 1,0 mL. Algumas espécies como tambaqui (*Colossoma macropomum*) podem liberar um volume alto de sêmen de 4 a 6 mL (Pinheiro et al., 2016). Pires (2016) ressalta que sem indução hormonal reprodutores de tambaqui liberam uma pequena quantidade de sêmen

(aproximadamente 0,5 mL). Outro trabalho realizado por Galo (2009) observou no pacu (*Piaractus mesopotamicus*) um volume de sêmen de 7,35 mL. O volume pode ser variável entre as diversas espécies e até mesmo na mesma espécie, por ser influenciado pela estação do ano, clima, período de repouso sexual e método de coleta (Murgas et al., 2011).

Neste estudo, os índices qualitativos do espermatozoide do *A. gigas* foram analisados utilizando animais mantidos em cativeiro. As coletas foram realizadas sem a estimulação hormonal. Sabe-se que os tratamentos hormonais podem afetar o volume seminal e na maioria das espécies de peixes que recebem o tratamento hormonal, é observado um aumento significativo no volume seminal (Viveiros et al., 2009; Murgas et al., 2015). Com relação às características do sêmen do pirarucu, Torati et al. (2024) o descreve como sendo diferente ao de outras espécies de água doce, com aparência translúcida e viscosa. Porém, neste trabalho foi possível obter uma coleta onde a amostra apresentou característica esbranquiçada com alta viscosidade. A presença desta amostra evidencia a complexidade dos parâmetros seminais, e demonstra a necessidade de estudos mais aprofundados sobre os fatores que influenciam a qualidade do sêmen desta espécie.

O número de espermatozoides/mL é irregular entre as espécies brasileiras (Murgas et al., 2015). Valores de concentração podem oscilar de acordo com o peso e idade do peixe, época do ano (Silva et al., 2009), frequência de coleta e volume do ejaculado (Murgas et al. 2011). No presente estudo, os reprodutores apresentaram uma concentração média de $5,63 \times 10^9$ espermatozoides mL^{-1} . Galo et al. (2019) observaram uma concentração espermática $14,35 \times 10^9$ espermatozoides mL^{-1} em *P. mesopotamicus*. Outro trabalho conduzido por França et al. (2022) mostra uma concentração de $5,9 \pm 2,1 \times 10^{10}$ espermatozoide mL^{-1} para o jundiá (*Rhamdia quelen*). Já Oliveira et al. (2015) para o *Brycon orbignyanus* identificou uma concentração de $18,31 \times 10^9$ espermatozoides/ mL^{-1} . Essas diferenças evidenciam que a concentração espermática é uma característica altamente espécie-específica, alguns autores como Viveiro & Godinho (2009) justificam que essa variação é esperada, pois a concentração pode ser afetada por vários fatores, como fase reprodutiva e se houve o uso de hormônio indutor da espermição, bem como qual o tipo de hormônio foi utilizado (Murgas et al., 2015).

Lesões na membrana plasmática levam à perda da sua capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle do movimento espermático (Aitken e Krausz, 2021; Spica, 2025). A integridade da membrana é um índice-chave da

capacidade celular, e qualquer célula com uma membrana danificada não pode realizar suas funções, ou seja, não pode fertilizar oócitos (Lahnsteiner, 2007; Torati et al. 2024). A análise da integridade da membrana indicou que mais de 59,1% das células espermáticas do *A. gigas* estavam intactas. Os valores observados de integridade de membrana indicam um quadro fisiológico menos favorável do sêmen avaliado, este resultado pode estar ligado a um possível declínio funcional dos espermatozoides, isso pode estar associado a diferentes fatores como o estágio avançado do ciclo reprodutivo, condições de manejo em cativeiro ou estresse decorrente da captura e manipulação dos animais. Além disso, não se pode descartar a influência do método de coloração utilizado, que pode superestimar lesões de membrana. No entanto, esse percentual foi inferior ao relatado por Torati et al. (2024), que observaram uma taxa de 72,1%. A integridade da membrana celular depende de vários fatores, incluindo nutrição dos peixes e outros fatores físicos/ambientais, especialmente a temperatura na gametogênese (Labbé, et al. 1996; Lahnsteiner, 2007; Torati et al. 2024). Entre estes fatores, a temperatura durante a gametogênese é essencialmente importante, pois regula a composição e a organização dos lipídios na membrana. Forte variações nesse período podem afetar a estabilidade da membrana, prejudicar a formação dos espermatozoides e comprometer sua motilidade e capacidade de fertilização.

Os espermatozoides de peixes são amplamente divergentes em forma e estrutura (Mattei, 1970; Jamieson e Leung, 1991; Hara e Okiyama, 1988; Dhanasekar et al., 2017). Os espermatozoides podem ser morfologicamente divididos em cabeça, peça intermediária e cauda (Nagahama, 1983; Murgas et al. 2011). Estudos comparativos revelam variação significativa no comprimento entre diferentes espécies de peixe. Faustino (2014) observou que o espermatozoide do *Brycon vermelha* possui cerca de 32,4 µm. Já em *Rachycentron canadum*, esse valor pode atingir 39 µm, conforme relatado por Dhanasekar et al. (2017). Em contraste, Jaspers et al. (1976) identificaram um comprimento muito superior, de 94,9 µm, nos espermatozoides do *Ictalurus punctatus*, evidenciando a diversidade morfológica entre espécies. Os espermatozoides de *A. gigas* têm dois flagelos, cabeça arredondada, uma peça intermediária mais curta e um comprimento total de 72µm (Torati et al., 2024). O aumento do comprimento do espermatozoide está associado às espécies que realizam fertilização no substrato onde os ovos são depositados, possivelmente devido às vantagens mecânicas que essa

característica oferece para superar barreiras físicas e facilitar a locomoção até o oócito (Balshine et al., 2001; Koenig et al., 2021).

Torati et al. (2024) mencionam outras espécies que apresentam espermatozoides biflagelados, destacando que, entre o osteoglossídeo, apenas o *H. niloticus* possui essa característica até o momento. Os mesmos autores também ressaltam que essa espécie compartilha diversas semelhanças biológicas com o pirarucu. Espermatozoides biflagelados também foram relatados por Matos et al. (2002) para o *Satanoperca jurupari*, membro da família Cichlidae. Se os espermatozoides biflagelados são vantajosos quando a competição espermática é alta, pode-se esperar que flagelos adicionais confirmem maiores habilidades competitivas, potencialmente aumentando a motilidade, melhorando a manobrabilidade ou excluindo outros espermatozoides de entrar na micrópila (Montgomerie et al., 2009; Koenig et al., 2021). Para Koenig et al. (2021) a morfologia espermática é influenciada pela competição espermática e pelo ambiente de fertilização, mas seu valor adaptativo específico ainda requer investigação detalhada, especialmente em casos como o espermatozoide biflagelado.

Assim, como nas outras variáveis que são analisadas, a morfologia espermática varia de espécie para espécie (Murgas et al., 2015). As alterações morfológicas primárias podem ocorrer devido a vários fatores, como efeitos biológicos (nutrição, idade, estágio de maturação gonadal) (Miliorini et al., 2011; Costa et al., 2019). No entanto, as alterações secundárias estariam relacionadas aos procedimentos de manejo durante a coleta do sêmen (Herman et al. 1994; Murgas 2011), osmolaridade do meio de ativação, preparação das lâminas, método de coloração das células espermáticas (Miliorini et al., 2011; Costa et al., 2019). No estudo de Shiro Junior (2013), por exemplo, foi registrada uma taxa de 95% de normalidade nos espermatozoides de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*). Costa et al. (2019) encontraram 67,35% de células normais para o jundiá (*Rhamdia quelen*).

A proporção de espermatozoides com morfologia normal para o pirarucu foi de 48,90%. A presença elevada de anomalias morfológicas pode comprometer significativamente a fertilização, tornando essencial relacionar a morfologia espermática com a concentração celular para a definição adequada da dose inseminação em sistema de reprodução em cativeiro (Costa et al., 2022). Nesta espécie, caracterizada por espermatozoides biflagelados, o flagelo quebrado foi a anomalia morfológica mais

recorrente, com ocorrência média de 17,70%, indicando elevado comprometimento estrutural da cauda e possível impacto sobre a eficiência do deslocamento celular. Espermatozoides com flagelos danificados certamente terão menos sucesso na fertilização devido à sua oscilação e movimento circular não progressivo (Kavamoto et al., 1999). Observou-se uma baixa incidência de espermatozoides com uma das caudas quebradas. Embora sua ocorrência tenha se mostrado limitada neste estudo, essa alteração estrutural pode comprometer a capacidade competitiva da célula na busca pela micrópila. Visto que o flagelo do espermatozoide tem duas funções principais: como propulsor e como leme, proporcionando motilidade e orientação, respectivamente (Boryshpolets et al., 2018)

O conhecimento da osmolaridade do sêmen em teleósteos, é essencialmente importante, pois os espermatozoides permanecem quiescentes na osmolaridade do plasma seminal (Vieira et al., 2011). Foi relatado que a osmolaridade do plasma seminal dos teleósteos varia de 230 a 350 mOsm/kg (Morisawa et al., 1983; Kowalski et al., 2019). Entre os peixes, a menor osmolaridade do plasma seminal é encontrada no esturjão e geralmente não excede 100 mOsm/kg, e a mais alta na perca eurasiática pode chegar a 500 mOsm/kg (Kowalski et al., 2019). Valores de osmolaridade seminal se diferem entre espécies de peixes. Para o *C. macropomum*, Pinheiro et al. (2016) reportaram $298,2 \pm 11,7$ mOsm/kg. Em contrapartida, França et al. (2020) registraram valores de 381 ± 8 mOsm/kg em *Brycon orbignyanus* e de 345 ± 16 mOsm/kg em *Prochilodus vimboides*. A osmolaridade registrada para o *A. gigas*, foi de $302,70 \pm 104,30$ mOsm/kg, valor que se aproxima dos observados para outras espécies de peixes. Valores mais baixos de osmolaridade podem estar associados a uma menor concentração iônica do plasma seminal e/ou contaminação por urina (França et al., 2020). A osmolaridade pode estar altamente relacionada e influenciar alterações da motilidade espermática, seu aumento ou diminuição podem favorecer fatores que podem elevar as alterações morfológicas.

A identificação de cistos espermáticos não rompidos no sêmen do pirarucu representa um achado incomum e de grande relevância para a compreensão da fisiologia reprodutiva da espécie. Apesar de ampla disponibilidade de estudos sobre a espermatogênese em peixes, a maioria das descrições de cistos espermáticos está restrita ao ambiente intratesticular, como parte do processo normal de desenvolvimento das células germinativas. Na maioria dos teleósteos, os cistos se abrem no final da espermiogênese, liberando os espermatozoides no lúmen do túbulo ou lóbulo (Dymek et

al. 2024). A presença dessas estruturas no ejaculado pode sugerir uma liberação incompleta atípica do conteúdo testicular, possivelmente relacionada a alterações nos mecanismos de espermição, falha no transporte espermático ou a um dano mecânico ocorrido no momento da coleta, particularmente no momento da massagem abdominal. A busca por referências específicas que relatem a ocorrência dessas estruturas no sêmen revelou-se limitada, indicando uma lacuna significativa no conhecimento sobre possíveis variações ou anomalias no processo de espermição. Essa falta de dados dificulta a comparação direta com outros estudos e reforça a importância de relatar e investigar tais peculiaridades, que podem ter implicações relevantes para a compreensão da fisiologia reprodutiva do *A. gigas*.

O CASA está especialmente bem adaptado para espermatozoides de peixes, cuja motilidade dura por períodos muito curtos e varia muito rapidamente (Fauvel et al., 2010). Na grande maioria das espécies de peixes de água doce, a motilidade não dura mais do que 0,5 a 2 minutos (Cosson, 2010). De acordo com Kowalski et al. (2019), nas últimas duas décadas o sistema consolidou-se como uma ferramenta amplamente utilizada e eficaz na avaliação da motilidade espermática, permitindo também a obtenção de um conjunto ampliado de parâmetros cinéticos, como VCL ($\mu\text{m.s}^{-1}$), VAP ($\mu\text{m.s}^{-1}$), VSL ($\mu\text{m.s}^{-1}$), PRG (%), LIN (%), WOB (%) e BCF (Hz). O CASA também permite rastrear os espermatozoides de forma individual, essa análise permite classificação heterogênea em subpopulações homogêneas, agrupando espermatozoides com padrões de motilidade semelhante (Martinez-Pastor et al., 2008). Segundo Fauvel et al. (2010), essa abordagem é relevante por possibilitar uma avaliação mais detalhada da qualidade seminal a partir da análise de clusters de espermatozoides.

Geralmente, a duração da motilidade é um trade-off entre o nível de estoques de energia possuídos por uma célula e o processo de dano osmótico experienciado pela célula (Boryshpolets et al., 2018). A motilidade é drasticamente afetada pelo tempo pós-ativação, o que limita o tempo de análise (Caldeira et al., 2019). Quando o espermatozoide é ativado pelo contato com meio externo, ele atinge a velocidade máxima quase imediatamente e começa a queimar os recursos de energia armazenados (Cosson, 2010.; Mäkinen et al., 2025). Enquanto na tilápia (*Sarotherodon melanotheron heudelotii*) essa atividade pode se prolongar por mais de uma hora (Legendre et al., 2016; Prokopchuk et al., 2017), na truta arco-íris é extremamente limitada, variando entre 20 e 30 segundos (Boryshpolets et al., 2013). Para o *A. gigas*, os resultados obtidos neste estudo indicam

um tempo médio de motilidade de $46,5 \pm 4,92$ segundos, situando a espécie em um padrão intermediário em relação a outras espécies.

Em geral, sêmen de alta qualidade deve apresentar uma taxa de motilidade dos espermatozoides acima de 80% (Kowalski et al., 2019). Estudos recentes demonstram que a taxa de motilidade espermática pode variar significativamente entre espécies de peixes, mas, em geral, apresenta índices elevados. Foram reportados valores próximos de 89,2% *C. macropomum* (Santos et al., 2023), chegando a 100% em *Prochilodus lineatus* (Andrade et al., 2012), 68,1% em *Brycon hilarii* (Costa et al., 2022), superior a 90% *Oreochromis niloticus* (Dzyuba et al., 2019), 96,7% em *Oncorhynchus mykiss* (Inanan et al., 2015). No pirarucu a motilidade apresentou valor médio próximo 58,43 %, revelando desempenho inferior a outras espécies comumente utilizadas na piscicultura. O entendimento da ativação da motilidade espermática é essencial para otimizar a fertilização artificial (França et al., 2020). A duração da motilidade pode ser influenciada por alguns fatores como a osmolaridade que envolve os espermatozoides (Alavi et al., 2019), os compostos do meio de ativação (Kowalski et al., 2019). Ainda, sabe-se que íons de potássio no sêmen tem efeitos inibitórios sobre a motilidade dos espermatozoides em trutas marrons (*Salmo gairdneri*) (Morisawa et al., 1980; Browne et al., 2014). Em ciprinídeos, foi demonstrado que o pH extracelular e intracelular influenciam a iniciação e duração da motilidade (Marian et al., 1997; Prokopchuk et al., 2017).

Conforme relatado por Boryshpolets et al. (2018), os espermatozoides de peixes caracterizam-se por uma elevada frequência inicial de batimentos flagelares, geralmente superior a 60 ciclos por segundo. Esse padrão de resposta intensa e imediata é uma característica comum para maioria das espécies e reflete a necessidade de deslocamento rápido logo após a ativação. Portanto, avaliar os parâmetros de motilidade próximo à ativação entre 6 e 8 segundos é essencial (Kowalski et al., 2019). Zabotto (2025) conseguiu iniciar as análises para truta arco-íris aos 5 segundos. A taxa de motilidade observada nesse estudo para o pirarucu pode estar associada ao fato de as análises terem se iniciado apenas aos 10 segundos pós-ativação. Em muitos peixes, o movimento atinge seu pico imediatamente após o contato com o meio ativador e diminui rapidamente. Assim, ao iniciar a avaliação após esse intervalo, é provável que o período de motilidade máxima não tenha sido capturado, o que pode ter levado a uma estimativa menor do real desempenho dos espermatozoides do pirarucu.

A avaliação da qualidade seminal do pirarucu deve ir além da descrição estrutural das células, incorporando análises funcionais capazes de captar a heterogeneidade do comportamento espermático. A compreensão dessa variabilidade é fundamental para interpretar de forma mais precisa o potencial reprodutivo da espécie, especialmente considerando suas particularidades morfológicas e fisiológicas. Nesse sentido, a aplicação de ferramentas estatísticas multivariadas, como análise de cluster, representa um avanço metodológico relevante ao permitir a identificação de subpopulações espermáticas.

A análise de cluster é um método de estatística multivariada comumente usada que agrupa espermatozoides usando parâmetros de um grande conjunto de dados (Kanno et al., 2017). Essa abordagem permite quantificar e caracterizar subpopulações de espermatozoides com distintos padrões cinéticos em amostras de sêmen, tanto em termos numéricos quanto em proporção relativa (Oliveira, 2019). Apesar das vantagens proporcionadas pelas informações obtidas através da análise de cluster, esse método ainda é pouco aplicado à análise da motilidade de espermatozoides de peixe (Gil et al., 2015). Neste trabalho, a aplicação da análise de cluster permitiu identificar grupos distintos de espermatozoides do pirarucu com padrões de movimento específico. Essa abordagem forneceu uma visão mais detalhada da variabilidade espermática, revelando subpopulações com maior ou menor desempenho, o que não seria perceptível apenas por médias gerais. Esses resultados contribuem para uma compreensão mais precisa do potencial reprodutivo da espécie.

Estudos com diferentes espécies de peixes têm demonstrado a presença de subpopulações espermáticas com padrões distintos de motilidade. Em *Solea senegalensis*, Martinez-Pastor et al. (2008) identificaram quatro clusters representando essas variações. No tambaqui (*C. macropomum*), Gallego et al. (2017) utilizaram a análise de cluster para avaliar a relação entre a velocidade dos espermatozoides e o sucesso de fertilização. De forma semelhante Kanuga et al. (2012) descreveram três subpopulações no sêmen da truta arco-íris (*O. mykiss*) além de citarem a ocorrência de subpopulações em outras espécies. Parâmetros de velocidade estão relacionados e influenciam diretamente outras variáveis, essas variáveis determinam o cluster ao qual cada espermatozoide pertence com um alto grau de precisão (Gil et al., 2015). Neste trabalho, foram reconhecidos quatro clusters distintos de espermatozoides. O isolamento de forma individual de cada célula espermática do pirarucu foi fundamental para poder estabelecer um padrão de

movimentação, e assim, agrupar cada célula em sua categoria (estáticas, lentas, intermediárias e rápidas). Com essa definição também foi possível verificar que o número de células muito rápidas foi expressivamente menor em comparação às outras categorias.

As configurações do *plugin* CASA foram adaptadas para distintas espécies, sendo ajustadas conforme as diferentes particularidades morfológicas e cinéticas dos espermatozoides. Essas configurações foram aplicadas para o *Danio rerio* (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007), *Rhamdia quelen* (Sanches et al., 2010), *Steindachneridion melanodermatum* (Bombardelli et al., 2011), *Steindachneridion parahybae* (Sanches et al., 2012) e *Oncorhynchus mykiss* (Zabotto, 2025). Sanches et al., (2012) observaram que dentre as configurações do plugin/CASA, a VCL, a VAP e a VSL são essenciais para avaliar os parâmetros espermáticos.

A classificação da motilidade espermática em peixes pode ser estabelecida por meio da velocidade, especialmente a VCL. Onde valores baixos indicam células imóveis e valores mais altos permitem diferenciar níveis de atividade, refletindo a qualidade do sêmen. Estudos em diferentes espécies de peixes têm estabelecido valores-limite de VCL para identificar células imóveis. Em *Lates calcarifer*, Marc et al. (2023) propuseram o ponto de corte em $VCL < 15 \mu\text{m.s}^{-1}$, enquanto para *Balantiocheilos melanopterus*, Podhorec et al. (2022) indicam $VCL < 10 \mu\text{m.s}^{-1}$. Já em *C. macropomum*, Gallego et al. (2017) consideraram $VCL < 20 \mu\text{m.s}^{-1}$, valor também adotado por Butzge et al. (2021) para *O. mikiss*. A caracterização espermática do *A. gigas*, representa um avanço estratégico para o aprimoramento das práticas reprodutivas aplicadas à espécie. A utilização de software livre possibilitou a avaliação de forma individualizada das células espermáticas, resultando em dados relevantes para compreensão desta ferramenta para análise espermática do pirarucu. Com isso, foi possível encontrar uma configuração para a avaliação espermática computadorizada que melhor se adeque para esta espécie. Verificou-se que as células consideradas móveis apresentaram velocidades iguais ou superiores a $41 \mu\text{m.s}^{-1}$. Com base nisso, a combinação que melhor considerou células móveis foi definida como $VSL = 10 \mu\text{m.s}^{-1}$, $VAP = 15 \mu\text{m.s}^{-1}$ e $VCL = 40 \mu\text{m.s}^{-1}$.

As velocidades espermáticas em peixes tendem a atingir seus valores mais elevados imediatamente após a ativação, conforme relatado em diferentes espécies (Alavi et al., 2006; Prokopchuk et al., 2017). Valores de VCL variam amplamente entre grupos, como na enguia europeia (*Anguilla Anguilla*) $164,31 \mu\text{m.s}^{-1}$, esturjão siberiano (*Acipenser*

baerii) 208, 68 $\mu\text{m.s}^{-1}$ e salmão do Atlântico (*Salmo salar*) 238, 19 $\mu\text{m.s}^{-1}$ (Caldeira et al., 2019). Em espécies neotropicais, também se observam diferenças marcantes, como no *Brycon insignis* (127,11 $\mu\text{m.s}^{-1}$) e *Brycon amazonicus* (116,36 $\mu\text{m.s}^{-1}$) (Seabra de Souza et al., 2022) além de *Steindachneridion parahybae* (132,71 $\mu\text{m.s}^{-1}$) (Sanches et al., 2016). Espécies de clima temperado, como a *Perca flavescens*, podem alcançar velocidades ainda mais altas, chegando a 379,70 $\mu\text{m.s}^{-1}$ (Dabrowski et al., 1996; Kowalski et al. 2019). O pirarucu apresentou VCL média de 394 $\mu\text{m.s}^{-1}$, superando os valores já descritos para a maioria das espécies. Destaca-se ainda a presença de células individuais com velocidades superiores a 790 $\mu\text{m.s}^{-1}$, resultado que pode estar associado à característica biflagelada dos espermatozoides dessa espécie. No entanto, essa hipótese demanda investigações adicionais para ser confirmada. Considerando o padrão de deslocamento das células, aquelas com trajetórias mais longas foram classificadas como rápidas, as intermediárias apresentaram caminho menor que as rápidas, mas superior às lentas; já as lentas exibiram deslocamento reduzido, distinto das células estáticas. Com base nesses critérios, sugerimos para o pirarucu a seguinte categorização: rápidos $\geq 238 \mu\text{m.s}^{-1}$; intermediários de 131 $\mu\text{m.s}^{-1}$ a 237 $\mu\text{m.s}^{-1}$; lentos 41 $\mu\text{m.s}^{-1}$ a 131 $\mu\text{m.s}^{-1}$ e os estáticos $< 41 \mu\text{m.s}^{-1}$.

A distância máxima entre frames define a maior velocidade permitida para que uma célula seja acompanhada pelo *software*. Quando um espermatozoide ultrapassa esse limite, ele deixa de ser reconhecido pelo sistema e é automaticamente removido da análise. Então, de forma cautelosa, para configuração nas análises espermáticas do *A. gigas* adotou-se usar o valor de ($d=12$), assegurando a detecção adequada das células de maior velocidade. Resultados próximos foram relatados para o *Rhamdia quelen*, com $d=12$ (Neumann et al., 2019), enquanto outros estudos com a mesma espécie indicaram um valor ligeiramente inferior, de $d=10$ (França et al. 2022). Já em *Steindachneridion parahybae*, observou-se um valor mais elevado, de $d=15$ (Sanches et al. 2012). A avaliação das trajetórias espermáticas, obtidas a partir de sequências de 25 e 100 frames em intervalos de 10 e 35 segundos, confirmou a adequação das configurações previamente estabelecidas. Durante o processamento, células que se deslocaram para fora do campo de visualização foram automaticamente desconsideradas, assim como aquelas classificadas como estáticas. Esse procedimento assegurou a aplicação correta dos critérios do padrão real de motilidade espermática.

As configurações propostas neste estudo para o pirarucu demonstram-se adequadas em amostras que apresentem cistos, garantindo resultados consistentes dentro dessas condições. Contudo, é evidente a necessidade de investigações adicionais que aprofundem essa questão. Uma possibilidade relevante seria aprofundar a análise dos cistos por meio de estudos histológicos, a fim de caracterizar de forma mais precisa sua natureza e propriedades estruturais. Outra alternativa seria o aumento da diluição das amostras, ainda que isso contrarie protocolos mais convencionais, pois pode melhorar a individualização das trajetórias e a robustez dos resultados. Tal abordagem pode não apenas aumentar a precisão das estimativas cinéticas, mas também contribuir para a definição de protocolos mais específicos e reprodutíveis para a espécie.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, a pesquisa contribuiu para avançar o conhecimento sobre a reprodução do pirarucu, evidenciando características únicas do sêmen. A padronização do *plugin* CASA no *software* ImageJ respeitando as características da espécie pode ser usada com eficiência na avaliação espermática. A presença de padrões rápido-linear, progressivo-curvilíneo e lento-irregular demonstra que a motilidade espermática do pirarucu é fundamentalmente heterogênea e organizada em subpopulações distintas. Orienta-se para esta espécie uma avaliação utilizando 50 frames (0,5s), e para o considerar as células móveis a combinação $VSL = 10 \mu\text{m s}^{-1}$, $VAP = 15 \mu\text{m s}^{-1}$ e $VCL = 40 \mu\text{m s}^{-1}$. A predominância de alterações como cabeça solta e flagelo quebrados trazem um impacto negativo sobre a funcionalidade dos espermatozoides. Esse cenário destaca a importância de protocolos analíticos específicos para espécies com morfologia biflagelada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken, J.J.; Krausz, C., 2011. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reprod.* 122(4): 497-506. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220497.22223>
- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2006. Sperm motility in fish. (II) Effects of ions osmolality: a review. *Cell Biol. Int.* 1-14. <https://doi:10.1016/j.cellbi.2005.06.004>
- Alavi, S.M.H., Cosson, J., Bondarenko, O., Linhart, O., 2019. Sperm motility in fish: (III) diversity of regulatory signals from membrane to the axoneme. *Theriogenology*. 136, 143-165.

Andrade, E.S., Ferreira, M.R., Paula, D.A.J., Murgas, L.D.S., Felizardo, V.O., Veras, G.C., 2012. Qualidade de gametas com a técnica de endoscopia em curimba (*Prochilodus lineatus*). Arch. Vet. Sci. 17, 37-43.

Balshine, S., Leach, B.J., Neat, F., Werner, N.Y., Montgomerie, R., 2001. Sperm size of African cichlids in relation to sperm competition. Behav. Ecol. 12, 726-731. <https://doi.org/10.1093/beheco/12.6.726>

Bombardelli, R.A., Mörschbacher, E.F., Gomes, E., Neumann, G., Marcos, R.M., Toledo, C.P.R., et al., 2011. Milt cryopreservation protocols to Iguazu surubim (*Steindachneridion melanodermatum*). In: World Aquac. World Aquaculture Society (WAS) (Ed.). WAS. Natal, Brasil, 157.

Borges, A.M., Araújo, K.O., Pivato, I., Navarro, R.D., 2020. Ultraestrutura e criopreservação de sêmen de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) em cativeiro. Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec. Belo Horizonte, 72, 253-261.

Boryshpolets, S., Kholodnyy, V., Cosson, J., Dzyuba, B. 2018., Fish sperm motility Analysis: the central role of the flagellum. Reprod. Fertil. Dev. v.30, n.6, 833-841. <https://doi.org/10.1071/rd17478>

Butzge, A.J., Yoshinaga, T. T., Acosta, O.D.M., Fernandino, J. I., Sanches, E. A., Tabata, Y. A., Oliveira, C., et al., 2021. Early warming stress on Rainbow trout juveniles impairs male reproduction but contrastingly elicits intergenerational themotolerance. Sci. Rep. 11:17053, Nature Portifólio. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96514-1>

Brandão, F.R., Gomes, L.C., Chagas, E.C., 2006. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante prática de rotina em piscicultura. Acta Amaz. v. 36, n. 3, 349-356.

Browne, R.K. Kaurova, S.A., Uteshen, V. K, Shishova, N.V., McGinnity, D., Figiel, C. R., et al., 2014. Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. Theriogenology. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.018>

Cabrita, E., Sarasquete, C., Martinez-Páramo, S., Robles, V. Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., et al., 2014. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. Aquac. Amsterdam, 432, p. 389-401. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.034>

Caldeira, C., Hernández-Ibáñez, S., Valverde, A., Martin, P., Herranz-Jusdado, J., Gallego, V., et al., 2019. Standardization of sperm motility Analysis by using CASA-Mot fot Atlantic salmon (*Salmo salar*), European eel (*Anguilla anguilla*) and Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*). Aquac. p.223-231, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.001>

Cavalcante, R.L.D., 2020. Investigação exploratória dos fatores genéticos associados ao sistema de determinação sexual em *Arapaima gigas* (Pirarucu). Dissertação (Mestrado em Bioinformática) – Programa de Pós-Graduação em Bioinformática, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

Caveiro, B.A.S., Pereira-Filho, M., Itussú, D.R., Gandra, A L., Crescêncio, R., 2003. Biomassa sustentável de juvenis de pirarucu em tanques-rede de pequeno volume. Pesq. Agropec. Bras. 38, 723-728. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003000600008>

Cosson, J., Groison, A. L., Suquet, M., Fauvel, C., Dreanno, C., Billard, R., 2010. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. J. Fish Biol. 76, 240-279. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02504.x>

Costa, B.B., Marques, L.S., Lassen, P.G., Rodrigues, R.B., Streit JR, D.P., 2019. Cryopreservation-induced morphological changes in the sperm of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). J. Appl. Ichthyol. 35, 987-993, Berlin. <https://doi.org/10.1111/jai.13928>

Costa, B.B., Povh, J.A., Sanches, E.A., Spica, L.N., Rodrigues, R.B., Teixeira, N. S., et al., 2022. Characterization of sperm quality in *Brycon hilarii*: How does morphology affect sperm movement? Theriogenology. <https://doi.org/10.1016/j.therwi.2022.100007>

Costa, B.B., 2022. Relação da morfologia espermática com a cinética dos espermatozoides de *Danio rerio* e *Brycon hilarii*. Tese (Doutorado em Zootecnia), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Dabrowski, K., Ciereszko, R.E., Ciereszko, A., Toth, G.P., El-Saidy, D., Ottobre, J.S., 1996. Reproductive physiology of yellow perch (*Perca flavescens*): environmental and endocrinological cues. J. Appl. Ichthyol. 9, 136-148. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1996.tb00079.x>

- Da Costa Amaral, A., Lima, A.F., Ganeco-Kirschnik, L.N., Almeida, F.L., 2020. Morphological characterization of pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) gonadal differentiation. J. Morphol. 281, 491-499. <https://doi.org/10.1002/jmor.21116>
- Dhanasekar, K., Selvakumar, N., Munusway, N., 2017. Ultrastructure of spermatozoa in cabia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766). Anim. Repr. Sci. 190, 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.005>
- Dzyuba, B., Legendre, M., Baroiller, J. F., Cosson, J., 2019. Sperm motility of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): effects of temperature on swimming characteristics. Anim. Reprod. Sci. 208, 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.01.010>
- Dymek, A.M., Kirschbaum, F., Tiedemann, R., Sieminski, K., Pacio, I., 2024. A new type of spermiogenesis in teleost fish: Formation of the aflagellate sperm in *Campylomormyrus compressirostris* (Osteoglossomorpha: Mormyridae). Zoology. 165, 126186. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2024.126186>
- Faustino, F., 2014. Spermatozoon ultrastructure and semen parameters of *Brycon vermelha* (Characiformes, Characidae). Anim. Reprod. Sci. 157, 17-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.03.008>
- Fauvel, C., Suquet, M., Cosson, J., 2010. Evaluation of fish sperm quality. J. Appl. Ichthyol. 26, 636-643. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01529.x>
- França, T.S., Motta, N.C., Egger, R.C., Oliveira, A.V., Murgas, L.D.S., 2020. Impact of activation solutions on fresh and frozen-thawed sperm motility and fertilization success for two species of migratory freshwater fishes. Theriogenology. 147, 6-15. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.016>
- França, T.S., Gomes, I.C., Sanches, E.A.; Atehortúa, M.P., Teixeira, N.S., Rodrigues, R. B. et al., 2022. Post-thaw dilution of *Rhamdia quelen* sperm improves the reproductive success. Anim. Reprod. Sci. 181, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107018>
- Figuerola, E., Valdebenito, I., Farias, J.G., 2016. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. Aquac. Res. 47, 1691-1705. <https://doi.org/10.1111/are.12630>

- Fogaça, F.H.S., Oliveira, E.G., Carvalho, S.E., Santos, F.J.S., 2011. Yield and composition of pirarucu fillet in weight classes. *Acta Sci. Anim Sci.* 33, 95-99. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v33i1.10843>
- Fontenele, O. 1948. Contribuição para o conhecimento da biologia do pirarucu, *Arapaima gigas* (Curvier), em cativeiro (Actinopterygii, Osteoglossidae). *Rev. Bras. Biol.*, 8, 445-459.
- Galo, J. M., 2009. Avaliação dos parâmetros seminais de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e sua relação com as taxas de fertilização, eclosão e morfologia das larvas. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade estadual de Maringá, Maringá, Brasil.
- Galo, J.M., Streit Jr, D.P., Oliveira, C.A., Povh, J.P., Fornari, D.C., Digmayer, M., 2019. Quality of fresh and cryopreserved semen and their influence on the rates of fertilization, hatching and quality of the larvae of *Piaractus mesopotamicus*. *Braz. J. Biol.* 79, 438-445. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.182391>
- Gallego, V., Cavalcante, S.S., Fujimoto, R.Y., Carneiro, P.C.F., Azevedo, H.C., Maria, A.N., 2017. Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Theriogenology*. 87, 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.001>
- Gallego, V., Asturiano, J.F., 2018. Sperm motility in fish: technical applications and perspectives through CASA-Mot systems. *Reprod. Fertil. Dev.* 30, 820-832. <https://doi.org/10.1071/rd17460>
- Gil Anaya, M.C., Calle, F., Pérez, C.J., Martín-Hidalgo, D., Fallola, C., Bragado, M.J., et al., 2015. A new Bayesian network-based approach to the analysis of sperm motility: application in the study of tench (*Tinca tinca*) semen. *Andrology*. 3, 956-966. <https://doi.org/10.1111/andr.12071>
- Godinho, H.P., Santos, J.E., Formagio, P.S., Guimarães-Cruz, R.J., 2005. Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). *Acta Zool.* 86, 289-294. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2005.00213.x>
- Hara, M., Okiyama, M., 1998. An ultrastructural review of the spermatozoa of Japanese fishes. *Bulletin of the Ocean Research Institute, University of Tokyo*, 33, 1-138.

Herman, H.A., Mitchell, J.R., Doak, G.A., 1994. The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle. Danville, IL: Interstate.

İnanan, B.E., Öğretmen, F., 2015. Determination of differences in the biochemical of sperm activating and non-activating ovarian fluids and their influence on sperm motility in rainbow trout (*Oncodhynchus mykiss*). Aquaculture 448, 539-544, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.018>

Jamieson, B.G., Leung, L.P., 1991. Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa: with a survey of Lophophorate, Echinoderm and protochordate sperm and an account of gamete cryopreservation. Cambridge, Cambridge University Press.

Jaspers, E.J., Avault, J.W.Jr., Roussel, J.D., 1976. Spermatozoal morphology and ultrastructure of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Trans. Am. Fish. Soc. 105, 475-480. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1976\)105%3C475:SMAUOC%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1976)105%3C475:SMAUOC%3E2.0.CO;2)

Kanno, C., Sakamoto, K.Q., Yanagawa, Y., Takahashi, Y., Katagari, S., Nagano, M., 2017. Comparison of sperm subpopulation structures in first and second ejaculated semen from Japanese black bulls by a cluster analysis of sperm motility evaluated by CASA system. J. Vet. Med. Sci. 79, 1359-65. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0012>

Kavamoto, E.T., Barnabe, V.H., Campos, B.S.E., Talmelli, E.F.A., 1999. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881)(Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae), Bol. Inst. Pesca 25, 61-66.

Kanuga, M.K., Drew, R.E., Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L., 2012. Subpopulation distribution of motile sperm relative to activation medium in steelhead (*Oncorhynchus mykiss*). Theriogenology 77, 916-925. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.09.020>

Koenig, L.A., Gallant, J.R., 2021. Sperm competition, sexual selection, and the diverse reproductive biology of Osteoglossiformes. J. Fish Biol. 99, 740-754. <https://doi.org/10.1111/jfb.14779>

Koulish, S., Kramer, C.R., Grier, H.J., 2002. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). J. Morphol. 254, 292-311. <https://doi.org/10.1002/jmor.10037>

- Kowalski, R.K., Cesjko, B.I., 2019. Sperm quality in fish: determinants and affecting factors. *Theriogenology* 135, 94-108. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.009>
- Labbé, C., Maisse, G., 1996. Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm cryopreservation: Relation to change in the lipid composition of plasma membrane. *Aquaculture* 145, 281-294. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01354-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01354-3)
- Lahnsteiner, F., 2007. Characterization of seminal plasma proteins stabilizing the sperm viability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Reprod. Sci.* 97, 151-164. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.01.003>
- Legendre, M., Alavi, S. M. H., Dzyuba, B., Linhart, O., Prokopchuk, G., Cochet, C., et al., 2016. Adaptation of semen characteristics and sperm motility to harsh salinity: extreme situations encountered by the euryhaline tilapia *Sarotherodon melanotheron heudelotii* (Dumeril, 1859). *Theriogenology* 86, 1251-1267. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.066>
- Lima, A. F., 2018. The influence of sex ratio on the reproduction of pirarucu, in captivity. *Acta Amaz.* 48, 38-41. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201701181>
- Lima, A. F., Varela, E. S., Maciel, P. O., Alves, A. L. Rodrigues, A. P. O.; Torati, L. S., et al., 2015. Manejo de plantel de reprodutores de pirarucu. Embrapa, Brasília, DF.
- Mäkinen, M., Karjalainen, J., et al., 2025. High sulfate concentration disturbs the sperm motility and fertilization of salmonids. *Theriogenology* 7, 100131. <https://doi.org/10.1016/j.therwi.2025.100131>
- Marc, A.F., Guppy, J.L., Marshall, H., Jerry, D.R., Rudd, D., Paris, D.B.B.P., 2023. Optimization of a non-activating medium for short-term chilled storage of barramundi (*Lates calcarifer*) testicular spermatozoa. *Fish Physiol. Biochem.* 49, 559-576. <https://doi.org/10.1007/s10695-023-01191-8>
- Marián, R., Krasznai, Z., Balkay, L., Emri, M., Trón, L., 1997. Role of extracellular and intracellular pH in carp sperm motility and modifications by hyperosmosis of regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Cytometry* 27, 374-382. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0320\(19970401\)27:4%3C374::aid-cyto9%3E3.3.co;2-a](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(19970401)27:4%3C374::aid-cyto9%3E3.3.co;2-a)

- Martinez-Pastor, F., Cabrita, E., Soares, F., Anel, L., Dínis, M. T., 2008. Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis* spermatozoa: a model for teleosts. *Reproduction* 135, 44-459. <https://doi.org/10.1530/rep-07-0376>
- Mattei, X. 1970. Spermiogénese comparée des poissons. *Comp. Spermatol.* 57-69.
- Matos, E., Santos, M. N. S., Azevedo, C., 2002. Biflagellate spermatozoon structure of the hermaphrodite fish *Satanoperca jurupari* (Heckel, 1840) (teleostei, Cichlidae) from the Amazon River. *Braz. J. Biol.* 62, 847-852. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842002000500014>
- Mendes, J. A. C., Araújo, K. S. S., Silva, J. S., Oliveira, R. S., Rocha, L. T. S., Morey, G. A. M., et al., 2023. Reprodução de peixes: indução hormonal de peixes reofílicos. In: *Pescando conhecimentos: Ciências e Perspectivas para o pescado do Maranhão e Brasil*. Editora Universitária UEMASUL, São Luiz, 11-58.
- Miliorini, A.B., 2006. Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Lavras, MG, Brasil.
- Miliorini, A.B., Murgas, L.D.S., Rosa, P.V., Oberlender, G., Pereira, G.J.M., Da Costa, D.V., 2011. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquaculture Research* 42, 177-187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02575.x>
- Mishu, M.M., Mostakim, L.S., Kahman, M.M., Rahman, M.K., Shahjahan, M., Islam, M.S., 2020. Sperm movement and morphological changes in the silver barb (*Barbonymus gonionotus*) exposed to quinalphos, *Environ. Sustain. Indic.* 8, 100083. <https://doi.org/10.1016/j.indic.2020.100083>
- Montgomerie, R., Fitzpatrick, J.L. 2009. Testes, sperm, and sperm competition. In: Jamieson, B.G. (Ed.), *Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and bony fishes): Phylogeny, reproductive system, Viviparity, spermatozoa.* 8B, 1-53. https://doi.org/10.1201/9780429094170-1?urlappend=%3Futm_source%3Dresearchgate
- Morisawa, M., Suzuki, K., 1980. Osmolality and potassium ion: Their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science* 210, 1145-1147. <https://doi.org/10.1126/science.7444445>

- Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., Yasuda, K. 1983. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. J. Exp. Biol. 107, 95-103. <https://doi.org/10.1242/jeb.107.1.95>
- Murgas, L.D., Felizardo, V.O., Ferreira, M.R., Andrade, E.S., Veras, G.C., 2011. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos (Importance of evaluation of reproductive parameters in native fish). Em Rev. Bras. Reprod. Anim 35, 186-191. www.cbpa.org.br (acessado em 16 de agosto de 2025).
- Murgas, L.D.S., Paula, D.A.J., Machado, M.R.F., Felizardo, V.O., Andrade, E.S., Veras, G.C., 2015. Avaliação de parâmetros reprodutivos em peixes nativos. In: Poli, C.R., Poli, A.T.B., |Andreatta, E.R., Beltrame, E. (Eds), Aquicultura no Brasil: Novas Perspectivas - Produção de organismos aquáticos. Editora da UFSC, Florianópolis, pp.441-461.
- Nagahama, Y., 1983. The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar WS, Randall D. J.; Donaldson E. M. (Eds). Fish physiology. New York: Academic Press. vol. 9, pp. 233-275. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60290-3](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60290-3)
- Nelson, J. S., Grande, T.C., Wilson, M.V.H., 2016. Fishes of the World. 5th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, pp. 153-154. <https://doi.org/10.1002/9781119174844>
- Neumann, G., Bombardelli, R. A., Toledo, C. P. R., Sanches, E. A., 2013. Análise espermática computadorizada em peixes de água doce: procedimento para uso do aplicativo CASA em software livre. Os Autores, Toledo, PR.
- Neumann, G., 2015. Computer assisted sperm analysis (CASA) em software livre empregado em análises espermáticas de peixes: citemetria e aplicação em rotina de reprodução artificial. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, PR.
- Neumann, G., 2019. Influência da qualidade de imagens e técnicas de rastreamento nos resultados de análise espermática assistida por computador (CASA-Mot) em peixes. Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo/PR.
- Neumann, G., Sanches, P.V., Bombardelli, R. A., 2019. Effects on motile sperm to egg ratio with use of cryopreserved *Rhamdia quelen* semen at different post-activation times. Anim. Reprod. Sci. 201, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.01.001>

- Núñez, J., Chu-Koo, F., Berland, M., Arévalo, L., Ribeiro, O., Duponchelle, F., Renno, J.F., 2011. Reproductive success and fry production of the paiche or pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz), in the region of Iquitos, Perú. Aquac. Res. 42, 815-822. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02886.x>
- Núñez, J., Díaz, A.V., Bazan-Albitez, R., Alfaro, C.R., Koua, D., Núñez, L., et al., 2018. Use of acoustic telemetry array for fine-scale fish behaviour assessment of captive Paiche, *Arapaima gigas* breeders. Aquac. Res. 49, 2296-2304. <https://doi.org/10.1111/are.13692>
- Oliveira, C.E. 1944. Piscicultura amazônica. A voz do Mar, 23. 104-106.
- Oliveira, D. A., 2019. Análise das subpopulações de espermatozóides móveis de carneiros selecionados por critérios etários e andrológicos e submetidos a métodos de conservação seminal. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, SE.
- Oliveira, D. J., Ashikaga, E. Y., Foresti, F., Senhorini, J. A., 2015. Indução à reprodução artificial e Caracterização espermática da piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Bryconidae, Characiformes), espécie em perigo de extinção. Evol. Conserv. Biodivers. 5, 10-19. <https://doi.org/10.7902/ECB.V5I2.71>
- Pinheiro, J.P.S., Leite-Castro, L.V., Oliveira, F.C.E. Linhares, F.R.A., Lopes, J.T., Salmito-Vanderley, C.S.B., 2016. Qualidade do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) criopreservado em diferentes concentrações de gema de ovo. Cienc. Anim. Bras. 17, 267-273. <https://doi.org/10.1590/1089-6891v17i225386>
- Pires, L. B., 2016. Características espermáticas de tambaqui em diferentes intervalos na mesma estação reprodutiva. Dissertação Mestrado, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.
- Podhorec, P., Knowles, J., Vysloulžil, J., Boryshpolets, S., Sotnikov, A., Holická, M., et al., 2022. The effect of hormonal treatment on selected sperm quality parameters and sex steroids in tropical cyprinid Bala Shark (*Balantiocheilos melanopterus*). Fishes, 7, 122. <https://doi.org/10.3390/fishes7030122>
- Prokochuk. G., Cosson, J., 2017. Biophysics of fish flagellar movement: present knowledge and original directions. In: Cytoskeleton – Structure, Dynamics, Function and Disease, pp. 127-148. <http://dx.doi.org/10.5772/66863>

Rebelatto Junior, I.A., Lima, A.F.; Rodrigues, A.P.O., Maciel, P.O., Kato, H.C.A., Mataveli, M., et al., 2015. Reprodução e engorda de pirarucu: levantamento de processos produtivos e tecnologias. Brasília, DF: Embrapa, pp. 1-102.

Rodrigues, J., Santos, R.S., Cordeiro, J.G., Leite, M., Oliveira, H.S.T.O., Tercya, H., et al., 2020. Seminal characterization of the Amazonian fire-eye tetra *Moenkhausia oligolepis* (Günther, 1864). Zygote 28, 453-458. <https://doi.org/10.1017/s0967199420000325>

Rodrigues, A.P.O., Moro, G.V., Santos, V.R.V., 2015. Alimentação e nutrição do pirarucu (*Arapaima gigas*). Palmas-TO: Embrapa Pesca e Aquicultura, pp. 1-24.

Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., Nash, J. P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture 234, 1-28. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.006>

Sanches, E.A., Bombardelli, R.A., Marcos, R.M., Neumann, G., De Toledo, C.P.R., Romagosa, E., 2010. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. Aquac. Res. 42, 153–156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02598.x>

Sanches, E.A., Marcos, R.M., Baggio, D.M., Tessaro, L., Balen, R.E., Bombardelli, R. A., 2011. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermatócrito. Rev. Bras. Zootec. 40, 1163-1167. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982011000600001>

Sanches, E.A., Marcos, R.M., Okawara, R.Y., Caneppele, D., Bombardelli, R.A., Romagosa, E., 2012. Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. J. Appl. Ichthyol. 29, 1114–1122. <https://doi.org/10.1111/jai.12165>

Sanches, E.A., Caneppele, D., Okawara, R.Y., Damasceno, D.Z., Bombardelli, R. A., Romagosa, E., 2016. Inseminating dose and water volume applied to the artificial fertilization of *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae): Brazilian endangered fish. Neotrop. Ichthyol. 14, e20140158. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140158>

Santos, J.P., Almeida, S.J.M., Costa, C.C., Ferreira, A. N. S., Teixeira, E.G., Guimarães, E.C., et al., 2023. Changes in sperm motility of amazonian fish tambaqui *Colossoma*

macropomum (Cuvier 1816) (Characiformes: Serrasalminidae) exposed to two pesticides. *Biota Neotrop.* 23, e20231471. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2023-1471>

Santos, R.S., 2022. Características quantitativas do sêmen do jundiá (*Rhamdia quelen*) contaminado com sangue. Dissertação Mestrado, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS.

Seabra de Souza, A.R., Mori, Y.S., Andrade, S.A.P., Valandro, J.S.I., Caneppele, D., Sanches, E.A., 2022. Ratio of sperm, oocytes and water for artificial fertilization of *Brycon insignis* (Characiformes: Characidae). *Aquac. Res.* 53, 1283-1283. <http://dx.doi.org/10.1111/are.15661>

Seabra de Souza, A.R., Altafin, J.P., Machado, B.K.V., Sanches, E.A., 2022. Dose inseminante e volume de água para fertilização artificial de ovócitos de matrinxã (*Brycon amazonicus*). In: *Open Science Research VII*, Editora Científica Digital, Cap. 9, pp. 136-149. <http://doi.org/10.37885/221010617>

Silva, A.M., Ducan, W.L.P., 2016. Aspectos biológicos, ecologia e fisiologia do pirarucu (*Arapaima gigas*): uma revisão da literatura. *Sci. Amaz.* 5, 31-46.

Silva, J.M.A., Murgas, L.D.S., Felizardo, V.O., Pereira, G.J.M., Navarro, R.D., Mello, R.A., 2009. Características seminais e índices reprodutivos de curimba (*Prochilodus lineatus*) em diferentes períodos reprodutivos. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* 10, 668-677.

Sousa, A.R.B., Corrêa, R.O., Faria, R.T., Maciel, P.O., Lima, L.K.F., Teixeira, R.N.G., 2017. Piscicultura de pirarucu. Brasília, DF: Embrapa Amazônia Oriental, coleção Criar, 7, pp. 169.

Souto, C.N., Faria, T.M., Oliveira, H.F., Rosa, R.M., Silva, L.A.S., Campos, M.A.F., 2017. Visão geral sobre reprodução de peixes teleósteos: da anatomia à sinalização molecular. *Pubvet Med. Vet. Zootec.* 11, 1175-1187. <https://doi.org/10.22256/pubvet.v11n11.1175-1187>

Shiro Junior, O.K., 2013. Características seminais de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*), na piracema. Dissertação Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

Spica, L.N., 2025. Caracterização da qualidade seminal de peixe: movimento espermático, parâmetros físico-químicos e avaliação computadorizada (CASA). Tese

Doutorado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, 39-59.

Streit Jr., D.P., Moraes, G. V., Ribeiro, R.P., Povh, J.A., Souza, E.D., Oliveira, C.A.L., 2004. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixe. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, 7, 157-162.

Torati, L.S., 2017. Reproductive physiology of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and development of tools for broodstock management. Tese de Doutorado, Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland.

Torati, L.S., Lopes, J.T., Lima, A.F., Puvanendran, V., Batlouni, S.R., Ganeco-Kirschnik, L.N., 2024. Feasibility of in vivo semen collection and description of the morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). Fishes 9, 24. <https://doi.org/10.3390/fishes9010024>

Venturieri, R., Bernardino, G., 1999. Pirarucu, espécie ameaçada pode ser salva através do cultivo. Ver. Panor. Aquic. 9, 13-21.

Vieira, M.J.A.F., Carvalho, M.A.M., Salmito-Vanderley, C.S.B., Salgueiro, C.C.M., Viveiros, A.T.M., Moura, A.A.A.N., et al., 2011. Características do sêmen do tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. Arch. Zootec. 60, 1263-1270. <https://doi.org/10.4321/S0004-05922011000400041>

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. Fish Physiology Biochemistry, p. 137-150, 2009).

WILSON-LEEDY, J. G., & INGERMANN, R. L. Manual for CASA plugin for ImageJ. 2006.

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*, 67(3), p. 661–672, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.003>

YAO, Z.; RICHARDSON, G.; CRIM, L. A diluent for prolonged motility of the ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm. Aquaculture 174: 183-193, 1999.

ZABOTTO, V. M. Análise espermática computadorizada em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*): padronização de configuração para o CASA/ImageJ. Dissertação (mestrado em Aquicultura), Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Jaboticabal, 2025.