

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

ANÁLISES ESPERMÁTICAS EM TRUTA ARCO-ÍRIS

(Oncorhynchus mykiss) (Walbaum, 1792):

CARACTERIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE

CONFIGURAÇÕES PARA O CASA/IMAGEJ

Vinicius Mecca Zabotto

Jaboticabal – São Paulo

2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

ANÁLISES ESPERMÁTICAS EM TRUTA ARCO-ÍRIS

(Oncorhynchus mykiss) (Walbaum, 1792):

CARACTERIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE

CONFIGURAÇÕES PARA O CASA/IMAGEJ

Vinicius Mecca Zabotto

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Sanches

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

Z12a

Zabotto, Vinicius Mecca

Análises espermáticas em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum, 1792): Caracterização e padronização de configurações para o CASA/ImageJ / Vinicius Mecca Zabotto. -- Jaboticabal, 2025

47 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal

Orientador: Eduardo Antônio Sanches

1. Aquicultura. 2. Espermatozoides. 3. Software. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: **Análises Espermáticas em Truta Arco-íris (*Oncorhynchus Mykiss*, Walbaum, 1792): Caracterização E Padronização De Configurações Para o Casa/imagej**

AUTOR: VINICIUS MECCA ZABOTTO

ORIENTADOR: EDUARDO ANTÔNIO SANCHES

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: 2025.07.31 15:27:02 -03'00'

Prof. Dr. EDUARDO ANTÔNIO SANCHES (Participação Virtual)
Departamento de Recursos Pesqueiros e Aquicultura / Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira
UNESP RegistroSP

Documento assinado digitalmente
 ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA
Data: 30/07/2025 21:40:47 -0300
Verifique em <https://validar.lti.gov.br>

Prof. Dr. ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de biologia e zootecnia / FEIS-Unesp, Ilha Solteira/SP

Documento assinado digitalmente
 RONAN MACIEL MARCOS
Data: 30/07/2025 21:47:00 -0300
Verifique em <https://validar.lti.gov.br>

Prof. Dr. RONAN MACIEL MARCOS (Participação Virtual)
Universidade Federal da Fronteira Sul / Laranjeiras do Sul/PR

Jaboticabal, 30 de julho de 2025

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| DEDICATÓRIA | 2 |
| AGRADECIMENTOS | 3 |
| RESUMO | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| 1. Introdução | 7 |
| 1.1 Espécie, origem, produção e introdução no Brasil | 7 |
| 1.2 Análises espermáticas | 9 |
| 2. Objetivo geral | 10 |
| 2.1 Objetivos específicos | 11 |
| 3. Material e métodos | 11 |
| 3.1 Seleção de reprodutores e captura de vídeos | 11 |
| 3.2 Testes para a padronização das configurações do CASA/ ImageJ | 13 |
| 3.2.1 Classificação do movimento espermático | 13 |
| 3.2.2 Combinações de velocidades mínimas para determinação da motilidade | 14 |
| 3.2.3 Máxima velocidade entre frames | 15 |
| 3.2.4 Comparação visual da trajetória dos espermatozoides | 15 |
| 3.2.5 Quantidade de frames ideais para avaliação | 15 |
| 3.2.6 Parâmetros espermáticos ao longo do tempo | 16 |
| 3.3 Análises estatísticas | 16 |
| 4. Resultados | 17 |
| 4.1 Classificação do movimento espermático | 17 |
| 4.2 Combinações de velocidades mínimas para determinação da motilidade | 19 |
| 4.3 Máxima velocidade entre frames | 20 |
| 4.4 Comparação visual da trajetória dos espermatozoides | 21 |
| 4.5 Quantidade de frames ideais para avaliação | 24 |
| 4.6 Parâmetros espermáticos ao longo do tempo | 26 |
| 4.7 Análise descritiva e correlação de Pearson/Spearman | 27 |
| 5. Discussão | 28 |
| 6. Conclusão | 34 |
| 7. Referências bibliográficas | 35 |

*“Que o mar seja gentil, que os elementos nos concedam a passagem e que os
bons ventos nos levem em segurança até o destino...”*

Veleiro Katoosh

DEDICATÓRIA

*À minha querida avó Cleonice e ao meu amado avô Nelson,
cujo carinho, sabedoria e amor deixam marcas eternas em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, por sua constante proteção e por guiar cada passo da minha vida.

À minha família — Kelly, Ricardo e Milena — por todo suporte, amor e incentivo; vocês são a base que molda meu ser.

À minha esposa, Paula, pelo apoio incondicional, parceria e companheirismo, que tornam minha jornada mais leve e significativa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Antônio Sanches, pelos ensinamentos, oportunidades e pela confiança.

Aos meus amigos e amigas que auxiliaram no desenvolvimento desta pesquisa. Em especial, Júlia e Janáina, obrigado por tudo sempre!

Ao Lé, Purga, Rosana, Yara, Neuza e Arno do Instituto de Pesca de Campos do Jordão, obrigado pela estrutura, suporte, ajuda e ensinamentos.

APOIO FINANCEIRO

CAPES, Bolsa de Mestrado, Processo n° 88887.955797/2024-00.
O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) -
Código de Financiamento 001

RESUMO

A truta arco-íris é um peixe da família dos salmonídeos que habita rios e riachos com baixa temperatura. Diversas técnicas reprodutivas podem ser empregadas em laboratório para otimização da reprodução, entre elas, análises de gametas utilizando *softwares* CASA são comumente utilizadas. Porém, para ser assertiva, necessita-se de padronização de configurações específicas para a espécie. Nesse sentido, objetivou-se determinar as configurações para a análise espermática computadorizada utilizando *CASA/ImageJ* para a espécie. Para tanto, utilizou-se sêmen proveniente de dezesseis machos da coloração padrão, da linhagem landlocked mantidos em cativeiro. As amostras foram devidamente ativadas para a captura do movimento espermático por meio de vídeos (100 fps), aos quais foram editados, cortados e utilizados como base de dados para uma sequência de testes. Em seguida, realizou-se a classificação do movimento espermático, combinações de velocidades mínimas para detecção de células progressivas, máxima velocidade entre frames, quantidade de frames e o tempo de movimento dos espermatozoides. De acordo com a classificação das células espermáticas evidenciou-se as quatro categorias para VCL ($\mu\text{m/s}$): rápidos >150; intermediários >70; lentos >25; estáticos <25 e predominância de movimentos circulares das células. A partir disso, concluiu-se que as análises espermáticas computadorizadas utilizando o software de código aberto ImageJ devem ser realizadas considerando-se as velocidades mínimas de 3, 6 e 25 ($\mu\text{m/s}$) para VSL, VAP e VCL, respectivamente, para a análise de 100 frames entre 5 e 6 segundos pós-ativação.

Palavras-chave: parâmetros espermáticos, sêmen, velocidades.

ABSTRACT

The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is a salmonid species that inhabits rivers and streams with low temperatures. Various reproductive techniques can be employed in laboratory settings to optimize breeding, among which gamete analyses using CASA software are commonly applied. However, to achieve accurate results, it is necessary to standardize species-specific settings. In this context, the present study aimed to determine the optimal configurations for computer-assisted sperm analysis using CASA/ImageJ for this species. For this purpose, semen was collected from sixteen males of the standard coloration, landlocked lineage, maintained in captivity. The samples were properly activated to capture sperm motility through video recordings (100 fps), which were subsequently edited and used as a database for a sequence of tests. Sperm motility classification was then performed, including combinations of minimum velocities for progressive cell detection, maximum velocity between frames, number of frames, and sperm movement duration. According to sperm cell classification, four VCL ($\mu\text{m/s}$) categories were observed: fast >150 , intermediate >70 , slow >25 , and static <25 , with a predominance of circular cell movements. Based on these results, it is concluded that computer-assisted sperm analyses using the open-source software ImageJ should be conducted considering minimum velocities of 3, 6, and 25 $\mu\text{m/s}$ for VSL, VAP, and VCL, respectively, analyzing 100 frames between 5- and 6-seconds post-activation.

Keywords: sperm parameters, semen, velocities.

1. Introdução

1.1 Espécie, origem, produção e introdução no Brasil

A truta arco-íris é um peixe incluído dentro da taxonomia pelo Filo: *Chordata*; Classe: *Actinopterygii*; Ordem: *Salmoniformes*; Família: *Salmonidae*; Gênero: *Oncorhynchus*; Espécie: *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Possui corpo alongado e fusiforme, seu dorso, cabeça, laterais e nadadeiras são cobertos por manchas pretas, sua coloração varia desde cores prateadas a escuras (FAO, 2023), alterando de acordo com o ambiente, a idade e o ciclo reprodutivo.

Endêmica do oeste da América do Norte, seu habitat natural inclui rios com substratos rochosos ou de cascalho com temperatura média de 10°C (TABATA e PORTS, 2004). Durante o inverno os animais migram sentido a montante do rio procurando locais propícios para reprodução, momento em que o fotoperíodo é menor e as águas apresentam menor temperatura (TABATA, 2006).

Se enquadrando entre as vinte espécies mais cultivadas do mundo, no ano de 2020, a produção da aquicultura em contexto mundial foi cerca de 739.500 toneladas (FAO, 2022). A criação dessa espécie é uma atividade que possui como pré-requisito um ambiente de criação de alta qualidade físico-química, sendo que o oxigênio dissolvido, temperatura e vazão da água são fatores limitantes para a produção. De acordo com Araújo *et al.* (2006), são características físico-químicas desejáveis: pH para fertilização 7 (variando entre 6,5 e 8,5), temperatura por volta de 10°C, e teor mínimo de oxigênio dissolvido 5,5 mg/L, destacando-se que a pressão atmosférica e temperatura variam a solubilidade do oxigênio no ambiente aquático.

A maturidade sexual é atingida aos 2 anos de idade (TABATA e PORTS, 2004), podendo variar dependendo da densidade de estocagem, temperatura e qualidade da alimentação (ARAÚJO *et al.*, 2006). Para que ocorra a reprodução artificial, os gametas são extrusados pelo método de massagem sentido encéfalo-caudal na região abdominal, sem utilização de indução com hormônio (ANDRADE e YASUI, 2003) e posteriormente adiciona-se o sêmen aos oócitos, para fertilização “à seco”, homogeneização e adição de água para ativação e fertilização dos gametas, seguida de períodos de incubação de ovos e alevinagem (TABATA, 2006).

A partir da disseminação da espécie para países tropicais e subtropicais da América do Sul, Ásia e África Oriental, desenvolveram-se linhagens domesticadas, como a *Shasta* e *Kamloops* (FAO, 2023). Destaca-se a diferença entre a linhagem anádroma, que realiza migração para água salgada em certa fase de vida e a “*landlocked*” que é resistente à água doce, podendo realizar seu ciclo completo na mesma (PASCUAL *et al.*, 2001). A linhagem “*landlocked*” (Figura 1) foi introduzida no Brasil em 1949, com uma iniciativa tomada pelo Ministério da Agricultura, sendo realizada a importação de ovos embrionados da Dinamarca (SATO *et al.*, 2011), com intuito de se povoar as regiões serranas que apresentavam naturalmente uma baixa ictiofauna nativa (FARIA, 1953).

Segundo alguns autores, a produção de truta no Brasil iniciou em meados de 1964, pela Estação Experimental de Salmonicultura “Dr. Ascânio de Faria” em Campos do Jordão, que realizou o fornecimento de ovos, alevinos e tecnologias científicas e produtivas para todo o país (PORTO-FORESTI *et al.*, 2002; BUTZGE *et al.*, 2021). Destacam-se, segundo Barbosa (2014), que os maiores produtores do país são encontrados nas regiões serranas dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo e Santa Catarina.



Figura 1. Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), espécie modelo deste trabalho.

Ilustração: Joseph Tomelleri

<https://fishspecies.dnrec.delaware.gov/FishSpecies.aspx?habitat=1&species=47>

1.2 Análises espermáticas

Ao longo da rotina de reprodução artificial, diferentes métodos para otimização da reprodução em cativeiro podem ser empregados, possuindo grande interesse por produções em larga escala. Dentre estes métodos, podemos destacar a avaliação da qualidade dos gametas, como é o caso da motilidade espermática que afeta diretamente o sucesso da fertilização (TVEDT *et al.*, 2001), alguns trabalhos ainda destacam parâmetros espermáticos como morfologia e sobrevivência dos espermatozoides (FOGLI DA SILVEIRA, *et al.*, 1988; RURANGWA, *et al.*, 2004; COSSON, 2010; ARAÚJO, 2011; SANCHES, *et al.*, 2013; SOUZA, 2022).

Alguns trabalhos utilizaram métodos subjetivos para análise seminal (SANCHES, *et al.*, 2009; VIVEIROS, *et al.*, 2009; ROMAGOSA, *et al.*, 2010), que ocorre a partir da visualização microscópica do sêmen por um avaliador treinado estipulando valores em escalas arbitrárias de 0, 1, 2, 3, 4 e 5, estes que representam, respectivamente, 0-5, 6- 20, 21-40, 41-60, 61-80 e 81-100% de espermatozoides móveis (CAROSFELD, *et al.*, 2003). Contudo, este tipo de análise deixa questionamentos uma vez que os resultados variam de acordo com a experiência do avaliador (NEUMANN *et al.*, 2013).

Com objetivo de melhorar esta técnica de análise, surgiram no mercado *softwares* especializados que realizam a análise espermática assistida por computador (CASA - *Computer Assisted Sperm Analyse*), como o *CRISMAS CASA (Computer-aided sperm motility analysis system)*, *Hobson Sperm Tracker (Sense and Vision Electronic Systems)* (BORYSHPOLETS, *et al.*, 2013) e *Integrated Semen Analysis System (ISAS®v1, PROISER R + D, S.L., Paterna, Spain)* (CALDEIRA *et al.*, 2019) fornecendo assim resultados precisos e detalhados do movimento dos espermatozoides. No entanto, tais tecnologias apresentam custos elevados limitando o acesso e aplicabilidade em determinados contextos (PURCHASE e EARLE, 2012).

Nesse sentido surgiu o *software* de código aberto *ImageJ*, que utiliza o *plug-in CASA* para realizar as análises espermáticas assistidas (WILSON-LEEDY e INGERMANN, 2006), ampliando perspectivas de análises espermáticas para os

peixes. O programa utiliza a avaliação de uma série de imagens a partir do vídeo de movimentação do espermatozoide para reconstruir sua trajetória utilizando como ponto central a cabeça de cada espermatozoide (ABAIGAIR *et al.*, 2012).

O *plug-in* CASA, fornece parâmetros espermáticos como percentual de motilidade, velocidade curvilínea, velocidade média de deslocamento, velocidade de trajetória média, retilinearidade, oscilação, progressão e frequência de batimentos (WILSON-LEEDY; INGERMANN, 2006). A motilidade espermática é um dos indicadores que possibilita a identificação dentro de um plantel de reprodutores, os animais que não possuem características seminais desejáveis para produção, otimizando-se assim os custos produtivos da piscicultura (RURANGWA, *et al.*, 1998; RURANGWA, *et al.*, 2001).

Para utilização do CASA, é necessário um conhecimento prévio sobre padrão de movimento espermático da espécie, ajustando de forma correta as cotas mínimas para que o *plug-in* encontre e considere células, como realizado com o zebrafish (*Danio rerio*) (WILSON-LEEDY e INGERMANN, 2007), surubim-do-paraíba (*Steindachneridion parahybae*) e jundiá (*Rhamdia quelen*) (SANCHES, *et al.*, 2010; SANCHES, *et al.*, 2013; NEUMANN, *et al.*, 2021). Desta forma, seguindo as metodologias utilizadas por estes autores, a utilização do CASA é precisa e adaptada para cada espécie de peixe em função do comportamento das células, fornecendo resultados confiáveis quanto aos parâmetros espermáticos.

Portanto, o desenvolvimento de padronizações específicas para a análise no *ImageJ plug-in* CASA de cada espécie é uma ferramenta de extrema relevância para o setor da piscicultura, sendo responsabilidade da comunidade científica a exploração e consolidação destes métodos e posterior disseminação dos conhecimentos para a sociedade aquícola, fomentando a otimização de recursos na piscicultura.

2. Objetivo geral

O objetivo foi realizar a padronização das configurações do *plug-in* CASA (*Computer Assisted Sperm Analyse*), instalado no software livre *ImageJ*, para a avaliação dos parâmetros espermáticos de *Oncorhynchus mykiss*.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a quantidade de frames adequados para análise dos parâmetros espermáticos da espécie.
- Avaliar a motilidade espermática ao longo do tempo em segundos.
- Realizar a caracterização do movimento espermático da espécie.

3. Material e métodos

3.1 Seleção de reprodutores e captura de vídeos

O experimento foi conduzido no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Aquicultura - Núcleo Regional de Pesquisa em Salmonicultura “Dr. Ascânio de Faria” (Campos do Jordão - SP) para coleta de dados durante o período reprodutivo (julho/2023) (CEEAIP 07/2018). e para análises posteriores nos Laboratórios de Aquicultura e Ecologia da Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira – UNESP Registro (Registro - SP).

Foram utilizados 16 machos precoces com (média±desvio padrão) 146,7±160,1 gramas de peso e 20,9±4,2 centímetros de comprimento total mantidos em sistema super-intensivo de criação em tanques *raceways* de ~20m³, com temperatura entre 10-15°C, alimentados diariamente “*ad libitum*” com ração comercial extrusada para carnívoros (45% proteína bruta). A seleção ocorreu mediante a liberação de sêmen com uma leve pressão abdominal, em seguida os animais foram alocados em caixas de 1000 L no laboratório, com renovação de água constante e mantidos em jejum por 24 horas.

Para a coleta, os exemplares foram anestesiados em benzocaína (100 mg/litro) (RANZANI-PAIVA *et al.*, 1998), contidos, secos e papila urogenital seca com papel toalha, a primeira gota de sêmen foi descartada a fim de reduzir a contaminação das amostras com urina. O sêmen foi coletado, mensurado em tubos do tipo Falcon (15 mL ± 0,1), aferido o pH por meio de fita colorimétrica indicadora e armazenado em caixa de isopor com gelox a 10-12°C para análises em sequência conforme Sanches *et al.* (2015).

Foram fixadas amostras para análises de: (1) Alterações morfológicas, a partir da coloração com rosa de bengala (1:10:1000/sêmen: rosa de bengala: formol salino tamponado (4,6%)) (2) Concentração espermática, com fixação em formol (1:1000/sêmen: formol salino tamponado (4,6%)) e contagem de células nos dois campos da câmara hematimétrica de Neubauer (SANCHES, *et al.*, 2015).

As análises espermáticas foram realizadas pelos métodos computadorizados disponíveis no *plug-in* CASA (WILSON-LEEDY & INGERMANN, 2006) no software de código aberto *ImageJ* (SCHINDELIN *et al.*, 2015). Para a captura dos vídeos utilizou-se um microscópio de luz trinocular (Solaris Bel) com objetiva de 10X, conectado a um computador (CPU intel core i5 © 1,6 GHz, 8 GB de Ram) com sistema operacional Microsoft Windows 10 ©. Os vídeos foram gravados com auxílio de uma câmera Basler acA640-120gc com taxa de captura de 100 frames por segundo e uma resolução de 658x492 pixels.

Para ativação das amostras, que ocorreu em uma proporção de 1:600 uL (sêmen: solução ativadora de 0,01% de NaHCO₃), uma alíquota de 1 uL de sêmen foi ativada em microtubo (1,5 mL) e homogeneizada. Em seguida 5 uL foi adicionado em uma câmara hematimétrica de Neubauer, coberta com lamínula e colocada no microscópio. No mesmo momento em que a solução ativadora foi adicionada ao sêmen, iniciou-se a captura do vídeo, dessa forma a análise dos vídeos foi a partir de 5 segundos (s) pós-ativação (SANCHES, *et al.*, 2010). Os vídeos foram capturados até o fim da motilidade e salvos (.avi) em diretórios específicos de cada exemplar em triplicata. Foi capturada uma foto da câmara de Neubauer utilizada na coleta para posteriores calibrações.

Para edição, os vídeos foram importados para o software *VirtualDub 1.10.4* e foram adicionados quatro filtros: *Brightness/Contrast* (+9%, -100%) para ajuste de brilho e contraste; *Threshold* (46%) para conversão em branco e preto, reduzindo o ruído das imagens; *Sharpen* (by6) e *Smoother* (g:0) para suavização das células. Após edição, os vídeos foram convertidos em sequências de imagens (.jpg) e exportadas para pastas específicas de cada macho com 100 frames cada corte em 5, 10, 15 e 20 segundos (NEUMANN *et al.*, 2013).

3.2 Testes para a padronização das configurações do CASA/ ImageJ

Para reconhecimento apenas das células, a fim de evitar sujeiras e ou ruídos, foram realizadas 10 medidas (pixels) da menor e 10 da maior célula, que forneceram o tamanho médio do menor e maior espermatozoide, portanto, na janela *Sperm Tracker* as opções “a” (Minimum sperm size) e “b” (Maximum sperm size) receberam os valores de 1 e 30 pixels, respectivamente (NEUMANN *et al.*, 2013).

Para calibração do *plugin* CASA a partir da câmara de Neubauer e microscópio utilizados durante a coleta, a foto capturada anteriormente foi utilizada para realizar 10 medidas de um retículo de 50 micrômetros (μm) (comprimento, largura, altura) por meio da função *ImageJ/Analyse/Mensure*. A partir destas medidas foi estabelecido que 50 μm equivalem 89,48 pixels(px), portanto, 1000 px são 558,78 μm . Desta forma a opção “r” (Microns per 1000 pixels) na janela *Sperm Tracker*, recebeu este valor ajustado ($r = 558.78$) para realização de todas as etapas seguintes. (NEUMANN *et al.*, 2013).

3.2.1 Classificação do movimento espermático

Para definir quando o software deve considerar espermatozoides estáticos ou móveis, primeiramente foi realizada uma avaliação individual das células espermáticas, de forma a compreender a diferença entre células lentas e as estáticas, que apresentavam pouco movimento e sem progressão (SANCHES, *et al.*, 2010).

O isolamento individual das células ocorreu a por meio da função “s” (*print xy co-ordinates for all tracked sperm*) com valor “s = 1” no *plugin* CASA, que forneceu as coordenadas das células isoladas em um plano cartesiano. Para forçar o programa a gerar o resultado mesmo que para uma célula estática, as velocidades mínimas (VSL, VAP, VCL) nas funções “e”, “f” e “g” foram igualadas a um (=1). Utilizando o software Microsoft Office Excel®, os resultados foram convertidos de pixels (px) para micrômetros (μm) a partir das medidas obtidas na câmara de Neubauer, realizadas anteriormente (89,48 px).

A velocidade curvilinear ($\mu\text{m/s}$) (VCL), velocidade média de deslocamento ($\mu\text{m/s}$) (VAP), velocidade em linha reta ($\mu\text{m/s}$) (VSL), retilinearidade (STR), oscilação (WOB) e linearidade (LIN) foram calculadas por meio das seguintes fórmulas (NEUMANN *et al.*, 2013):

$$VCL = \frac{\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}}{0,01} \quad VAP = \frac{\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}}{0,01} \quad VSL = \frac{\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}}{0,31}$$

$$STR = \frac{VSL}{VAP} * 100 \quad WOB = \frac{VAP}{VCL} * 100 \quad LIN = \frac{VSL}{VCL} * 100$$

$\Delta x =$ Variação da posição do espermatozoide no eixo "x"

$\Delta y =$ Variação da posição do espermatozoide no eixo y

0,01 = Variação do tempo em função dos pontos das coordenadas

0,31 = Variação do tempo em função do ponto inicial e final da trajetória média

Os resultados calculados em Excel® de forma manual como descrito acima, foram comparados com os resultados gerados pelo *plugin* CASA no mesmo momento utilizando a função "t" (*Print motion characteristics for all motile sperm*) com valor "t = 1" (NEUMANN *et al.*, 2013). Para a classificação, foram analisados os resultados gerados pelo *plugin* CASA em trajetórias de 0,5 segundos, correspondendo a 50 frames. Cada categoria de velocidade contribuiu com 96 células, sendo seis células por macho, utilizando 16 machos na análise. As classificações foram: estáticas, lentas, intermediárias e rápidas.

3.2.2 Combinações de velocidades mínimas para determinação da motilidade

A partir dos resultados das velocidades dos espermatozoides classificados por categorias, foram realizadas 12 combinações para testes, indicando os valores mínimos de VSL, VAP, VCL na janela *Sperm Tracker* (SANCHES *et al.*, 2010; 2013). As combinações das velocidades ($\mu\text{m/s}$) testadas foram: **1)** VSL=3, VAP=4, VCL=15; **2)** VSL=3, VAP=4, VCL=20; **3)** VSL=3, VAP=4, VCL=25; **4)** VSL=3, VAP=6, VCL=15; **5)** VSL=3, VAP=6, VCL=20; **6)** VSL=3, VAP=6, VCL=25; **7)** VSL=3, VAP=8, VCL=15; **8)** VSL=3, VAP=8, VCL=20; **9)** VSL=3, VAP=8, VCL=25;

10) VSL=3, VAP=10, VCL=15; **11)** VSL=3, VAP=10, VCL=20; **12)** VSL=3, VAP=10, VCL=25.

Para avaliar a capacidade do *plugin* CASA em distinguir com êxito as células estáticas das lentas, foi avaliado a motilidade espermática dos 16 machos, utilizando três vídeos por macho, no intervalo 100 frames em 15 segundos pós-ativação. Foram avaliados a taxa de motilidade (%) e a velocidade média de deslocamento (VAP - $\mu\text{m/s}$). Devido à variação observada entre os machos, estes foram agrupados como blocos para a análise.

3.2.3 Máxima velocidade entre frames

A função “*d*” no *plugin* CASA (*maximum speed velocity between frames (pixels)*) é compreendida por uma cota da máxima velocidade em pixels que uma célula pode possuir entre os frames para que seja avaliada, uma vez que valores altos podem capturar células adjacentes e valores baixos podem excluir células rápidas. Portanto, foram testados para este parâmetro os valores de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 para três vídeos de cinco machos cada em 5 segundos pós-ativação. Avaliou-se a MOT, VCL, VAP e número de espermatozoides (NSPZ).

3.2.4 Comparação visual da trajetória dos espermatozoides

De acordo com os passos anteriores, foram escolhidas as configurações na janela *Sperm Tracker* que fornecessem menos prejuízo para as avaliações. A partir disto, realizou-se um teste comparativo de quatro trajetórias dos espermatozoides de um único macho (M1) em um único vídeo (V1), em 5 e 10 segundos pós-ativação avaliado com utilização de 25 e 100 frames em cada momento.

Para tanto, as trajetórias geradas pelo *plugin/CASA* foram comparadas com a somatória de todas as imagens em sequência importadas, utilizou-se a função do *ImageJ/Image/Stacks/ZProject/Projection Type: max intensity* (SANCHES, *et al.*, 2010; 2013)

3.2.5 Quantidade de frames ideais para avaliação

Com intenção de determinar o tempo de vídeo que melhor se adequa para a análise espermática da truta arco-íris, realizou-se os testes com 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 frames, correspondente a 0,25s, 0,50s, 0,75s, 1,0s, 1,5s, 2,0s, 3,0s de vídeo. A análise foi realizada em 5 segundos pós-ativação nos 16 machos/blocos, com três vídeos cada um.

Foram avaliados todos os parâmetros, sendo eles: Motilidade (MOT), Velocidade Curvilínea (VCL), Velocidade Média de Deslocamento (VAP), Velocidade em Linha Reta (VSL), Retilinearidade (STR), Oscilação (WOB), Progressão (PROG) e Número de Espermatozoides (NSPZ).

3.2.6 Parâmetros espermáticos ao longo do tempo

Após obter todas as configurações anteriores adequadas para nossa base de dados da espécie, realizou-se a avaliação ao longo do tempo, a cada 5 segundos de 5 a 20 segundos, da mesma forma nos 16 machos/blocos, com três vídeos cada um. Avaliou-se todos os parâmetros MOT, VCL, VAP, VSL, STR, WOB, PROG, NSPZ.

3.3 Análises estatísticas

Os espermatozoides isolados e classificados em quatro categorias (item 3.2.1) foram submetidos a análise descritiva e os resultados do cálculo manual e programado foram comparados pelo teste t-student de comparação de médias à 5% de significância.

Para MOT e VAP em função das 12 combinações testadas (item 3.2.2) realizou-se uma análise de variância de efeitos principais (ANOVA *main effects*) à 5% de significância, em caso de efeito significativo aplicou-se o teste de comparação de médias de Tukey ao mesmo nível.

A função “d” frente aos diferentes valores testados de 4 a 16 (item 3.2.3) foi submetida a uma análise de regressão segmentada e teste de platô/ruptura, avaliando-se a taxa de motilidade, VCL, VAP e NSPZ.

Para a quantidade de frames adequados para análise espermática (*item 3.2.5*), em todos os parâmetros foi realizada uma regressão segmentada estipulando o breakpoint.

Para os parâmetros espermáticos ao longo do tempo (*item 3.2.6*) de 5 a 20 segundos pós-ativação aplicou-se uma ANOVA *main effects* à 5% de significância considerando os machos como fator bloco e em caso de efeito o teste de Tukey ao mesmo nível.

Os dados de alterações morfológicas, concentração espermática, volume de sêmen e pH seminal foram somados aos parâmetros espermáticos de cada macho e avaliados por uma análise descritiva e correlação linear de Pearson e em caso de efeito por Shapiro-Wilk (5% de significância) optou-se pela correlação de Spearman.

Para todas as análises realizadas, foram checados os devidos pressupostos de homogeneidade dos resíduos e homoscedasticidade de variâncias, respectivamente, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov à 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas no *software* RStudio© versão 2024.04.2 2009-2024 Posit Software, PBC Release (e4392fc9, 2024-06-05) for Windows e *software* Microsoft Office Excel® 365 - suplementos: Análise de dados + Real Statistics + Solver.

4. Resultados

4.1 Classificação do movimento espermático

Após a realização da análise descritiva para o isolamento individual das células, conforme as quatro categorias predefinidas, Estáticos, Lentos, Intermediários e Rápidos, surgiram as características das células espermáticas de cada uma delas (Tabela 1). De acordo com as configurações aplicadas, foram encontrados, respectivamente, valores aproximados para VSL, VAP e VCL das células por categorias: Estáticas 3, 4 e 25 $\mu\text{m/s}$; Lentas 10, 15 e 70 $\mu\text{m/s}$; Intermediárias 40, 50 e 110 $\mu\text{m/s}$; Rápidas 70, 120 e 200 $\mu\text{m/s}$.

Em relação a comparação dos métodos empregados, o calculado e o programado não se observou diferença estatística ($P>0,05$) entre eles, mostrando que ambos estão ajustados para a identificação das células.

Tabela 1. Resultados gerados pelo *plugin* CASA e estatística descritiva de espermatozoides de *Oncorhyncus mykiss* divididos em categorias.

| Classificação | Parâmetros | n | CASA | Mediana | Min | Max | D.P. |
|-----------------------|-------------------------|----------|-------------|----------------|------------|------------|-------------|
| Estáticos | VCL ($\mu\text{m/s}$) | 96 | 19,26 | 16,74 | 8,37 | 71,42 | 9,40 |
| | VAP ($\mu\text{m/s}$) | 96 | 3,30 | 2,90 | 1,45 | 9,82 | 1,57 |
| | VSL ($\mu\text{m/s}$) | 96 | 2,32 | 1,88 | 1,01 | 8,58 | 1,35 |
| | STR (%) | 96 | 0,70 | 0,73 | 0,35 | 0,96 | 0,17 |
| | WOB (%) | 96 | 0,19 | 0,16 | 0,08 | 0,49 | 0,09 |
| | LIN (%) | 96 | 13,79 | 10,92 | 4,06 | 47,03 | 9,01 |
| Lentos | VCL ($\mu\text{m/s}$) | 96 | 72,34 | 71,20 | 12,14 | 145,96 | 30,23 |
| | VAP ($\mu\text{m/s}$) | 96 | 14,54 | 13,99 | 2,20 | 34,90 | 6,51 |
| | VSL ($\mu\text{m/s}$) | 96 | 9,26 | 8,27 | 1,08 | 31,71 | 5,88 |
| | STR (%) | 96 | 0,62 | 0,65 | 0,19 | 0,95 | 0,21 |
| | WOB (%) | 96 | 0,23 | 0,19 | 0,08 | 1,09 | 0,16 |
| | LIN (%) | 96 | 15,16 | 11,06 | 1,47 | 98,76 | 15,41 |
| Intermediários | VCL ($\mu\text{m/s}$) | 96 | 107,66 | 108,64 | 32,07 | 190,78 | 29,48 |
| | VAP ($\mu\text{m/s}$) | 96 | 52,26 | 50,13 | 24,10 | 92,46 | 15,67 |
| | VSL ($\mu\text{m/s}$) | 96 | 39,52 | 38,60 | 13,50 | 79,74 | 12,60 |
| | STR (%) | 96 | 0,77 | 0,85 | 0,32 | 0,96 | 0,17 |
| | WOB (%) | 96 | 0,51 | 0,50 | 0,18 | 1,00 | 0,18 |
| | LIN (%) | 96 | 39,71 | 36,31 | 11,95 | 94,41 | 17,32 |
| Rápidos | VCL ($\mu\text{m/s}$) | 96 | 209,85 | 209,59 | 150,99 | 274,74 | 25,45 |
| | VAP ($\mu\text{m/s}$) | 96 | 127,69 | 121,27 | 55,23 | 216,35 | 39,26 |
| | VSL ($\mu\text{m/s}$) | 96 | 68,59 | 53,11 | 9,24 | 185,67 | 46,85 |
| | STR (%) | 96 | 0,49 | 0,43 | 0,16 | 0,94 | 0,21 |
| | WOB (%) | 96 | 0,61 | 0,61 | 0,24 | 0,98 | 0,18 |
| | LIN (%) | 96 | 32,89 | 24,97 | 4,07 | 92,16 | 22,35 |

Resultado do CASA (CASA), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR), oscilação (WOB) e linearidade (LIN), mínimo (Min), máximo (Max), desvio padrão (D.P.).

4.2 Combinações de velocidades mínimas para determinação da motilidade

A partir dos resultados dos espermatozoides classificados por categorias, foram determinadas combinações de velocidades mínimas para teste de reconhecimento das células, de forma a encontrar a combinação que reconhece as células lentas e desconsidera-se as estáticas.

Os resultados dos machos frente as combinações foram utilizados para realização da ANOVA *main effects*, observando-se diferença significativa entre as combinações ($P < 0,05$) (Figura 2). A partir disso observou-se que combinações com valores altos das velocidades impactam na redução da MOT, ou seja, as restrições impostas nesse caso, não consideram espermatozoides lentos, diminuindo significativamente a quantidade de células consideradas móveis pelo software. Comportamento contrário é verificado para a VAP. Assim, verifica-se a necessidade da utilização de uma combinação intermediária para maior assertividade nas análises em questão, optando-se por considerar a combinação '6', com $VSL=3 \mu\text{m/s}$, $VAP=6 \mu\text{m/s}$ e $VCL=25 \mu\text{m/s}$.

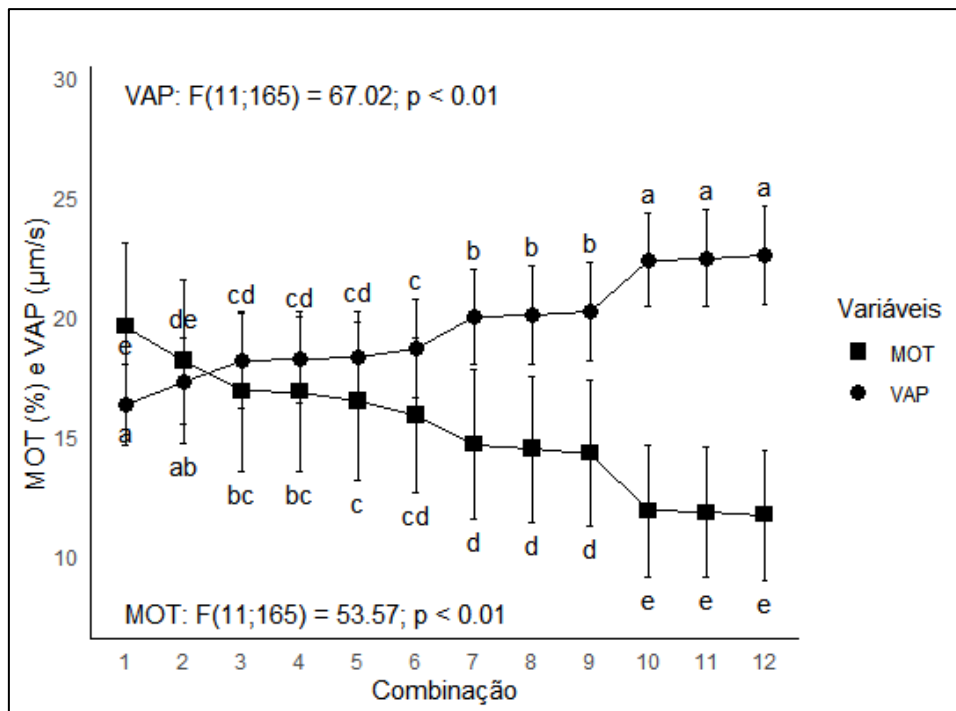


Figura 2. Resultados da taxa de motilidade (MOT) e a velocidade média de deslocamento (VAP) de espermatozoides de *O. mykiss* analisados com 100 frames (1s) de vídeo em 15 segundos pós-ativação em função das diferentes combinações de velocidades mínimas ($\mu\text{m/s}$) testadas para considerar células como móveis. Sendo: **1)** VSL=3, VAP=4, VCL=15; **2)** VSL=3, VAP=4, VCL=20; **3)** VSL=3, VAP=4, VCL=25; **4)** VSL=3, VAP=6, VCL=15; **5)** VSL=3, VAP=6, VCL=20; **6)** VSL=3, VAP=6, VCL=25; **7)** VSL=3, VAP=8, VCL=15; **8)** VSL=3, VAP=8, VCL=20; **9)** VSL=3, VAP=8, VCL=25; **10)** VSL=3, VAP=10, VCL=15; **11)** VSL=3, VAP=10, VCL=20; **12)** VSL=3, VAP=10, VCL=25. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença pelo teste de Tukey (P<0,05).

4.3 Máxima velocidade entre frames

Para o teste da função “*d*” observou-se que à medida que se aumentava a máxima velocidade entre frames na caixa de diálogo *Sperm Tracker*, os resultados aumentavam linearmente até um ponto de platô e a partir deste, não apresentava um aumento expressivo. Este comportamento foi significativo para o teste de breakpoint, encontrando o ponto de platô/ruptura (Figura 3) para MOT em 6,41 (Figura 3A), para VAP em 6,45 (Figura 3B), VCL em 6,52 (Figura 3C) e NSPZ em 7,86 (Figura 3D).

A partir disso optou-se por utilizar o valor padrão de “ $d = 8$ ” na caixa de diálogo, uma vez que o CASA conseguiria reconhecer células rápidas que surgissem no campo de visualização, de forma a não prejudicar a análise das demais células.

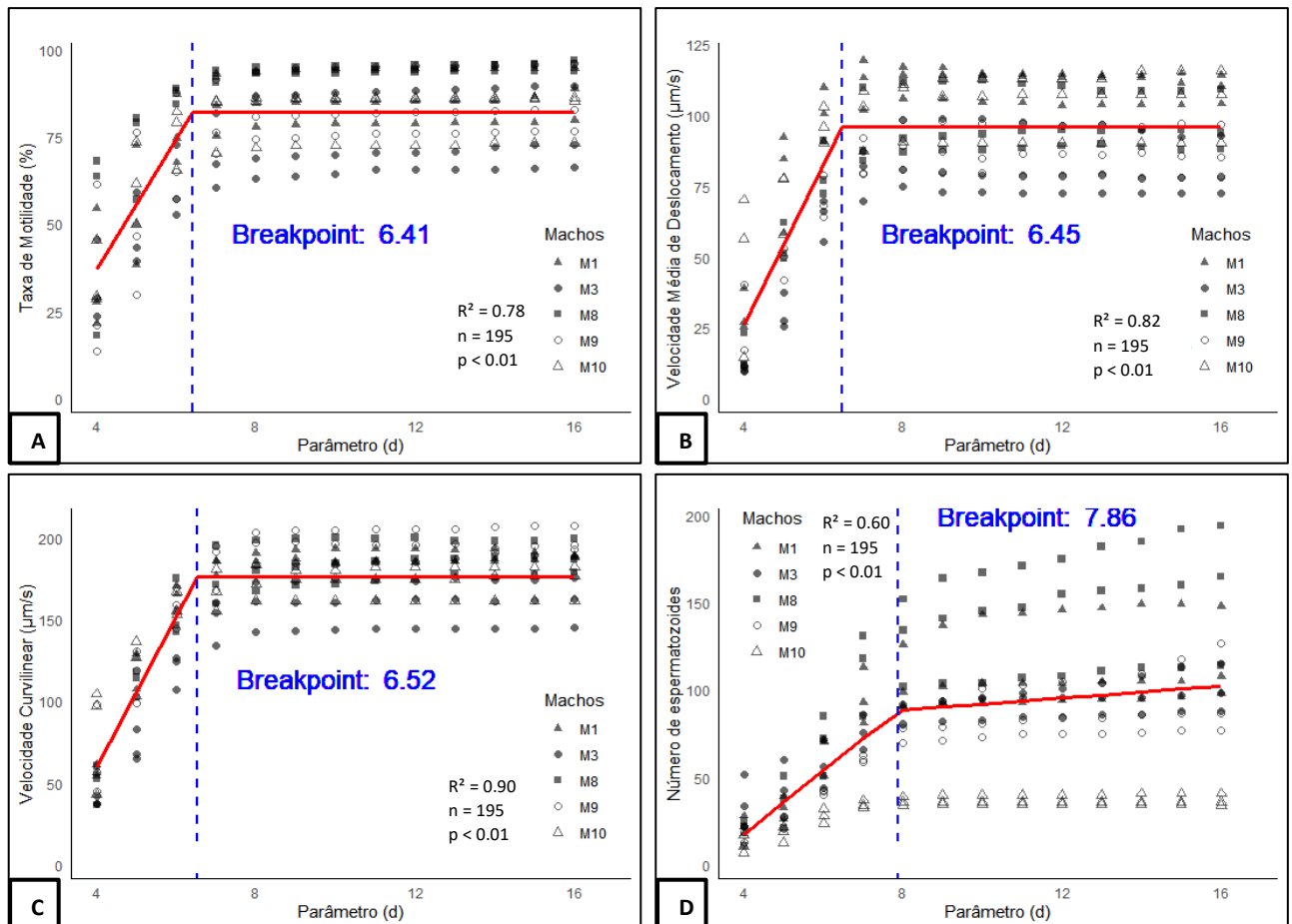


Figura 3. Diferentes valores testados para o parâmetro “ d ” (máxima velocidade entre frames – pixels) e resposta dos resultados da (A) taxa de motilidade (MOT), (B) velocidade média de deslocamento (VAP), (C) velocidade curvilinear (VCL) e (D) número de espermatozoides (NSPZ) para cinco machos em 5 segundos pós-ativação, avaliando-se 50 frames (0,5s).

4.4 Comparação visual da trajetória dos espermatozoides

Partindo dos resultados anteriores, foi possível aplicar o CASA com parâmetros ajustados e comparar a trajetória das células analisadas pelo *plugin* com as trajetórias “reais” de todas as células nas imagens importadas (Figura 4), sendo realizados os comparativos em 5 e 10 segundos, com 25 e 100 frames.

SEQUÊNCIA DE IMAGENS – “Zproject”

IMAGENS GERADAS PELO CASA

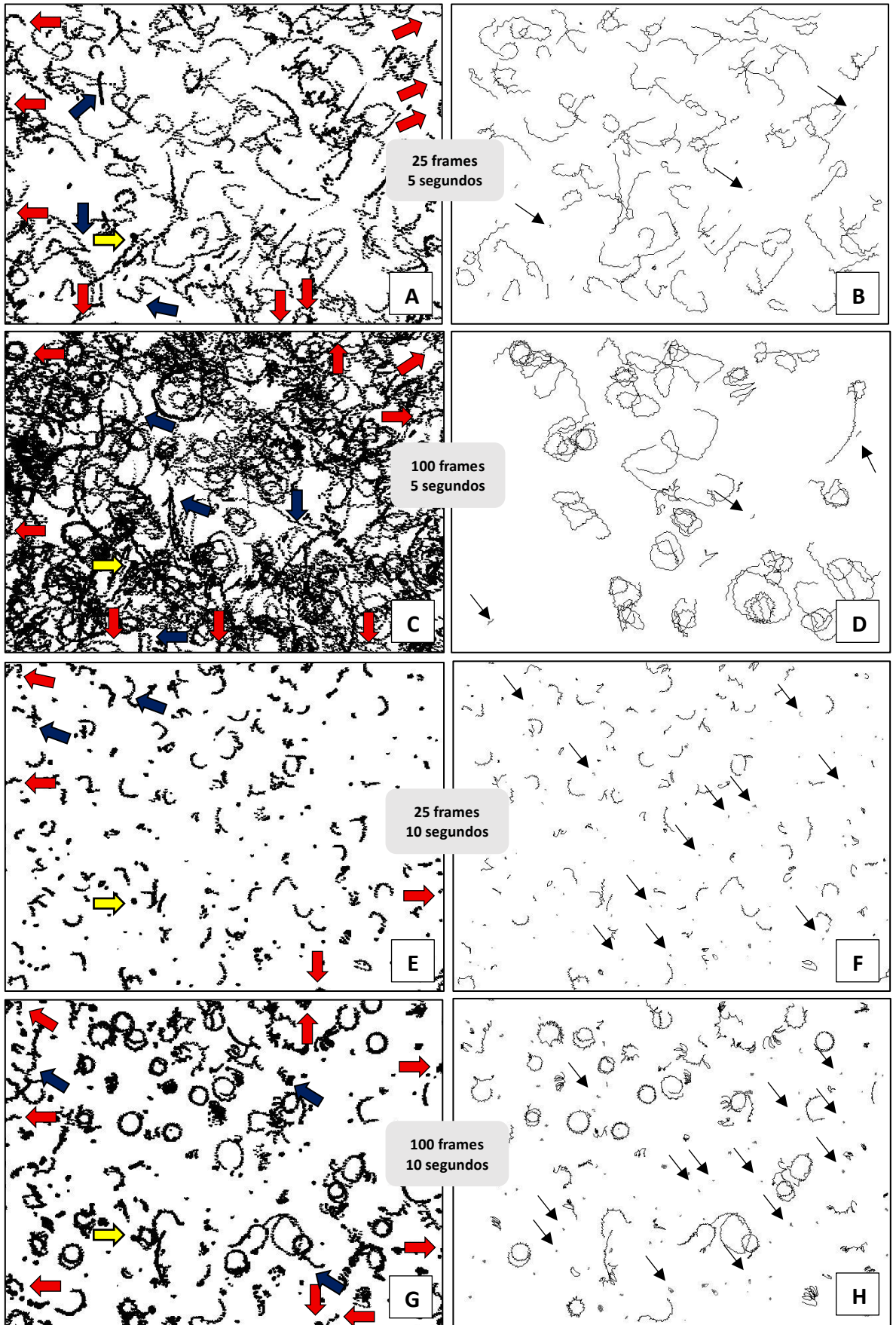


Figura 4. Comparação visual de trajetórias de espermatozoides geradas pelo

ImageJ/Zproject (somatória de todas as imagens em sequência importadas – lado esquerdo) e geradas pelo *plugin* CASA (lado direito). Comparativo visual em 5s pós-ativação para 25 frames (0,25s) (A e B) e para 100 frames (1s) (C e D). Comparativo visual em 10s pós-ativação para 25 frames (0,25s) (E e F) e para 100 frames (1s) (G e H). Setas pequenas estreitas pretas, indicam células que não foram consideradas devido a configuração aplicada. Setas grandes largas indicam espermatozoides que não foram considerados pelo CASA, as azuis são células que colidiram, as vermelhas as que saíram do campo de visualização e as amarelas uma partícula de sujeira no vídeo.

A partir disto, foi possível verificar se as células espermáticas classificadas como estáticas, de fato não estavam contribuindo na análise e se as rápidas estavam sendo consideradas de forma a não prejudicar o resultado. Nesse sentido, após verificar o funcionamento das configurações de acordo com as trajetórias, foram isoladas quatro células, uma de cada categoria para observação dos parâmetros espermáticos (Figura 5), ficando claro a diferença entre elas principalmente pelas velocidades, VCL, VAP e VSL que tem o valor proporcionalmente crescente partindo da categoria estática.

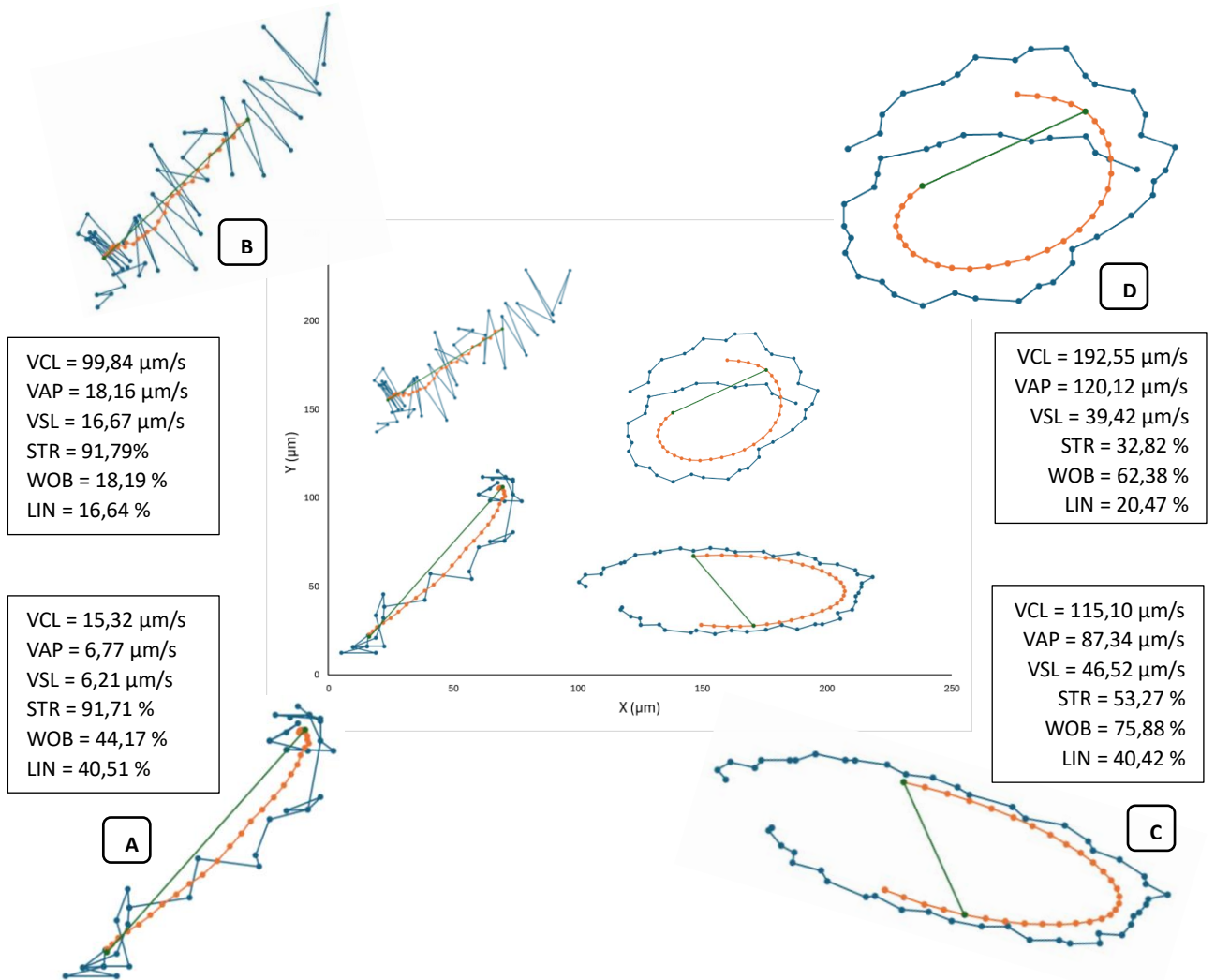


Figura 5. Trajetórias e parâmetros do movimento espermático de quatro espermatozoides isolados um de cada categoria: A) Estáticos, B) Lentos, C) Intermediários e D) Rápidos. Análise em 50 frames (0,5 s).

4.5 Quantidade de frames ideais para avaliação

A quantidade de frames utilizada para a avaliação afetou diretamente os resultados obtidos. Quando aplicado a regressão segmentada (Figura 6) foi observado diferença significativa para o teste de breakpoint para VSL, STR, PROG e NSPZ, com os respectivos valores 82,32, 80,57, 59,14 e 68,56. Com relação a MOT, VAP e VCL, não foi observado diferença, onde ambos obtiveram o breakpoint de 75. Devido aos resultados se aproximarem de 100 frames, optou-se por inserir

na caixa de diálogo *Sperm Tracker* na opção “*c – minimum track length (frames)*” o valor “*c = 100*”.

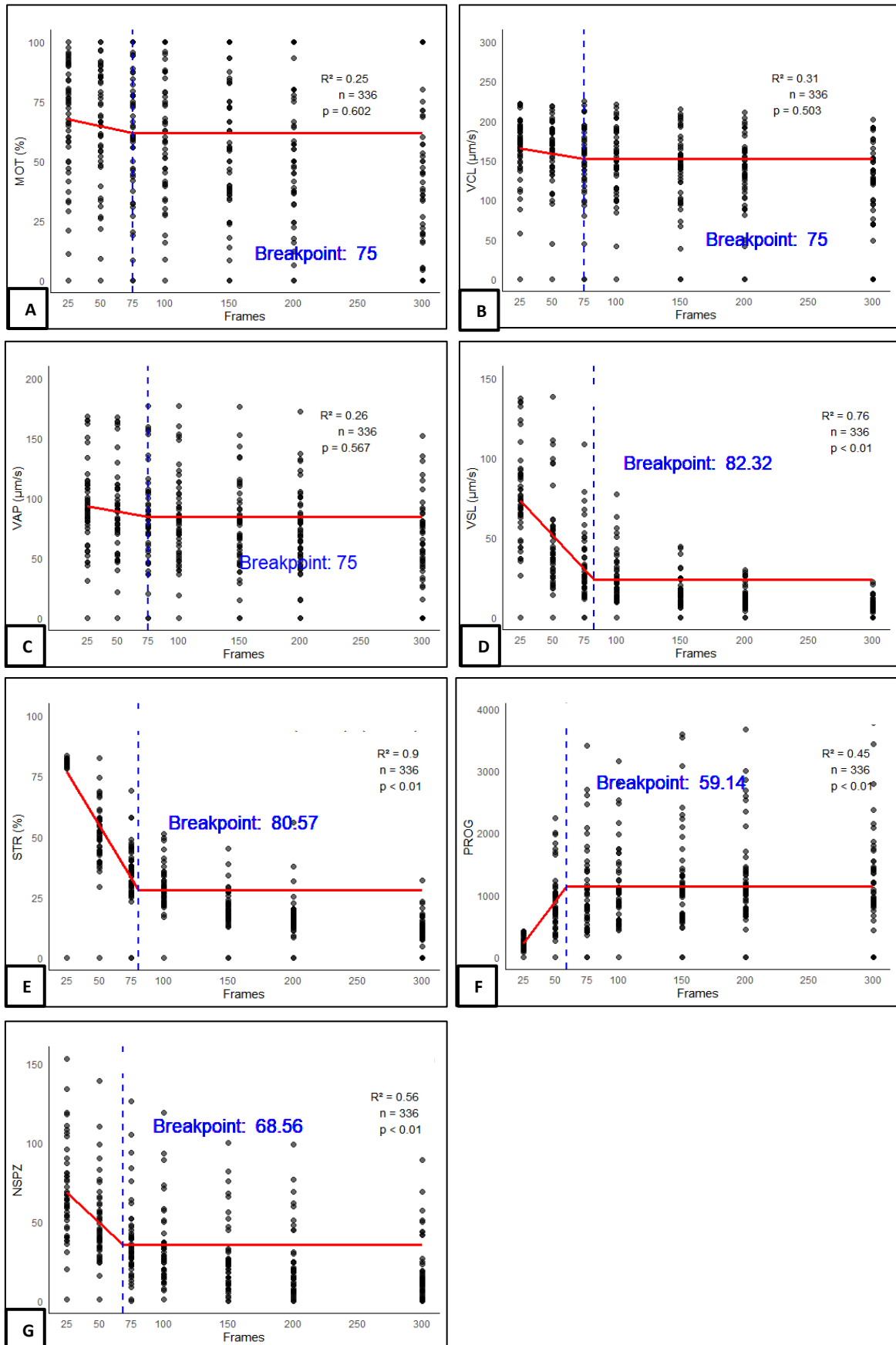
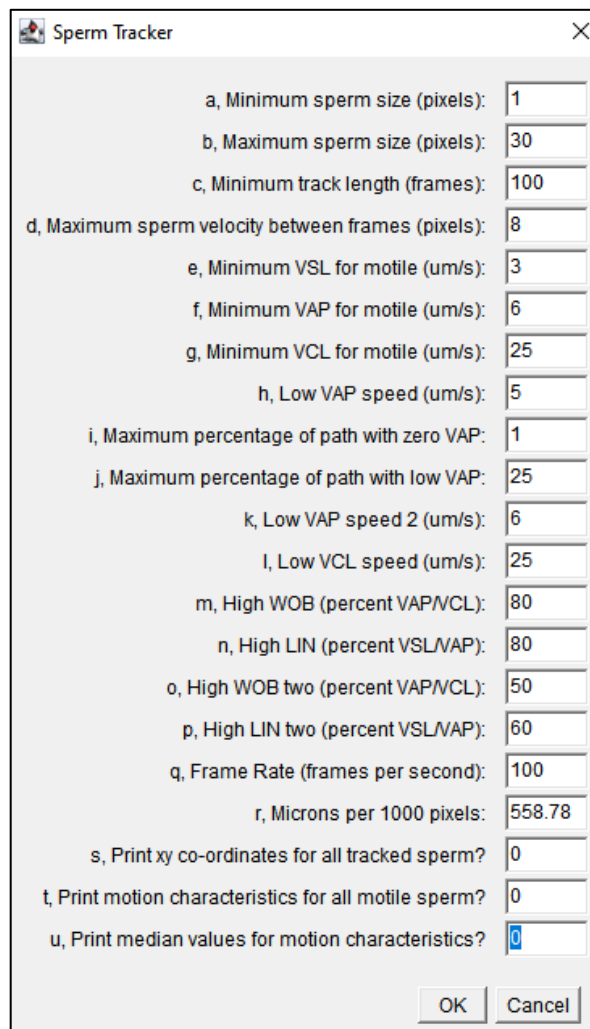


Figura 6. Regressão segmentada, teste de breakpoint para (A) MOT, (B) VCL, (C) VAP, (D) VSL, (E), STR, (F) PROG, (G) NSPZ.

4.6 Parâmetros espermáticos ao longo do tempo

Visto que o CASA apresentou pleno funcionamento, foi possível definir os valores para serem inseridos na caixa de diálogo *Sperm Tracker* para análise dos parâmetros espermáticos ao longo do tempo (Figura 7).



| Parameter | Value |
|---|-------------------------------------|
| a, Minimum sperm size (pixels): | 1 |
| b, Maximum sperm size (pixels): | 30 |
| c, Minimum track length (frames): | 100 |
| d, Maximum sperm velocity between frames (pixels): | 8 |
| e, Minimum VSL for motile (um/s): | 3 |
| f, Minimum VAP for motile (um/s): | 6 |
| g, Minimum VCL for motile (um/s): | 25 |
| h, Low VAP speed (um/s): | 5 |
| i, Maximum percentage of path with zero VAP: | 1 |
| j, Maximum percentage of path with low VAP: | 25 |
| k, Low VAP speed 2 (um/s): | 6 |
| l, Low VCL speed (um/s): | 25 |
| m, High WOB (percent VAP/VCL): | 80 |
| n, High LIN (percent VSL/VAP): | 80 |
| o, High WOB two (percent VAP/VCL): | 50 |
| p, High LIN two (percent VSL/VAP): | 60 |
| q, Frame Rate (frames per second): | 100 |
| r, Microns per 1000 pixels: | 558.78 |
| s, Print xy co-ordinates for all tracked sperm? | <input type="checkbox"/> |
| t, Print motion characteristics for all motile sperm? | <input type="checkbox"/> |
| u, Print median values for motion characteristics? | <input checked="" type="checkbox"/> |

Figura 7. Janela “*Sperm Tracker*” do plugin CASA no software *Image J* com as configurações estabelecidas para análise computadorizada de espermatozoides da truta arco-íris (*O. mykiss*).

Houve efeito significativo ($P < 0,01$) para todos os parâmetros analisados em função do tempo (Figura 8), uma vez que MOT (Figura 8A), VCL, VAP, VSL (Figura 8B), PROG e WOB (Figura 8C), apresentaram diferença estatística pelo teste de Tukey ao longo dos quatro tempos, mostrando uma redução considerável do movimento espermático. Os parâmetros STR (Figura 8C), BCF e NSPZ (Figura 8D) mostraram efeito significativo, para NSPZ com aumento gradativo já STR e BCF tiveram uma queda de 15 para 20 segundos.

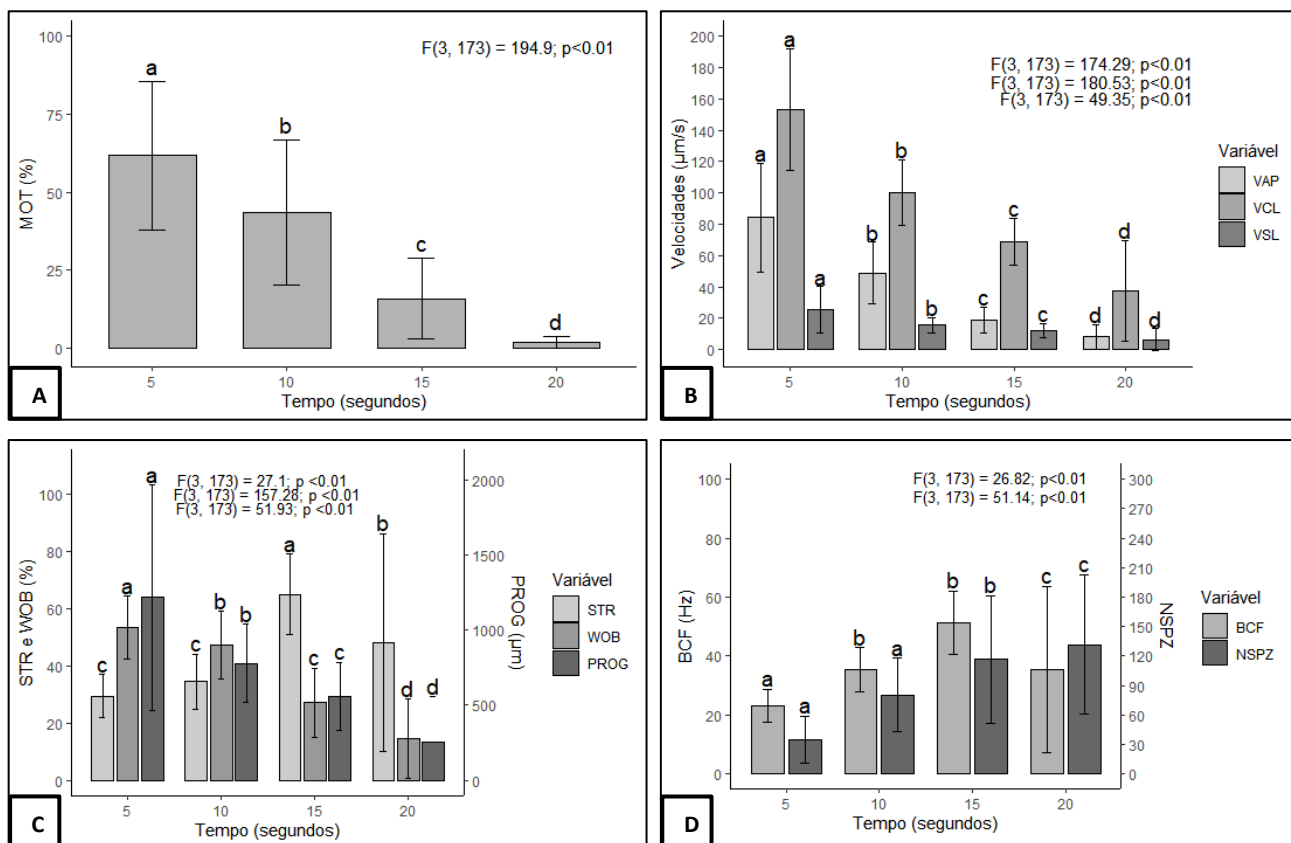


Figura 8. Análise de variância de efeitos principais (ANOVA *main effects*) para MOT (A), VCL, VAP e VSL (B), STR, WOB e PROG (C), BCF e NSPZ (D) em 5, 10, 15 e 20 segundos pós-ativação. Letras diferentes indicam efeito ($p < 0,05$) para o teste de Tukey.

4.7 Análise descritiva e correlação de Pearson/Spearman

Após a avaliação dos parâmetros espermáticos dos 16 machos utilizados neste estudo, foi possível realizar uma caracterização da qualidade seminal e espermática em geral (Tabela 2), realizando-se uma análise descritiva com avaliação em 5s de vídeo com 1,0 segundo (100 frames) de análise, sugerindo

valores condizentes para a espécie segundo a literatura (DIETRICH, *et al.*, 2005; BORYSHPOLETS, *et al.*, 2013).

Tabela 2. Parâmetros seminais e espermáticos de 16 machos de *O. mykiss* utilizados para coleta de sêmen e avaliação dos parâmetros computadorizados em 5s com 100 frames.

| Parâmetros | Média | Min | Máx | D.P. |
|---|--------------|------------|------------|-------------|
| Volume de sêmen (mL) | 3,09 | 0,50 | 8,00 | 1,78 |
| pH | 8,28 | 7,50 | 8,50 | 0,36 |
| Concentração (x10 ¹⁰ spz/ml) | 1,10 | 0,27 | 3,43 | 0,74 |
| Células normais (%) | 71,30 | 20,17 | 89,17 | 19,40 |
| MOT (%) | 61,67 | 19,01 | 98,04 | 23,20 |
| VCL (µm/s) | 153,09 | 91,86 | 211,93 | 33,69 |
| VAP (µm/s) | 84,18 | 36,71 | 156,04 | 32,22 |
| VSL (µm/s) | 25,26 | 11,29 | 59,14 | 13,11 |
| STR (%) | 29,29 | 21,11 | 41,10 | 4,90 |
| WOB (%) | 53,40 | 41,24 | 74,62 | 10,04 |
| PROG (µm) | 1218,59 | 522,66 | 2939,28 | 664,04 |
| BCF (Hz) | 23,07 | 12,12 | 30,86 | 4,50 |
| NSPZ | 35,00 | 12,67 | 97,67 | 22,00 |

Potencial hidrogeniônico (pH). Concentração espermática (estimada em espermatozoides por mililitros). Células normais (percentual de células sem alterações morfológicas). Taxa de motilidade (MOT). Velocidade curvilínea (VCL). Velocidade média de deslocamento (VAP). Velocidade em linha reta (VSL). Retilinearidade (STR). Oscilação (WOB). Progressão (PROG). Frequência do batimento transposto (BCF). Número de espermatozoides (NSPZ). Mínimo (Min). Máximo (Max). Desvio padrão (D.P.).

O teste de correlação de Pearson/Spearman dentro dos parâmetros seminais e espermáticos (Tabela 3) apresentou efeito ($p < 0,05$) para algumas correlações, como por exemplo a MOT que apresentou correlação positiva com a maioria dos parâmetros, com exceção de BCF e NSPZ, estes que apresentaram característica inversamente proporcional a MOT, VCL, VAP, VSL, PROG e Normais.

5. Discussão

A partir dos testes realizados foi possível determinar as configurações mais assertivas para as análises espermáticas computadorizadas por meio do *plugin*

CASA do software livre *ImageJ*, uma ferramenta eficiente, precisa e confiável para análises objetivas de qualidade seminal (VERSTEGEN, *et al.*, 2002).

Com relação às células espermáticas, destaca-se a importância da classificação entre elas, principalmente entre as categorias estáticas e as lentas, uma vez que estáticas não possuem movimento progressivo e conseqüentemente baixa capacidade fecundante, mesmo que realizadas as devidas correções de doses inseminantes (NEUMANN, *et al.*, 2019). Desta forma, categorizando as células compreende-se qual o comportamento das que possuem movimento progressivo, como é o caso das lentas e a partir delas então considerasse células com motilidade.

Alguns trabalhos com salmonídeos e outras famílias de peixes destacam que se deve considerar células imóveis com VCL <20 $\mu\text{m/s}$ (BUTZGE, *et al.*, 2021; KUTLUYER, *et al.*, 2014; GALLEGO, *et al.*, 2017; LAHNSTEINER, *et al.*, 1996). Contudo, a partir dos resultados observados neste estudo, identificamos que utilizando 20 $\mu\text{m/s}$ como a cota mínima, ainda são selecionadas células com movimentação no próprio eixo, sem progressão. Nesse sentido, propomos para a truta arco-íris a seguinte classificação: Rápidos >110 $\mu\text{m/s}$; Intermediários >70 $\mu\text{m/s}$; Lentos >25 $\mu\text{m/s}$; Estáticos <25 $\mu\text{m/s}$.

Tabela 3. Correlação linear de Pearson e Spearman* dos parâmetros seminais e espermáticos (CASA) avaliados em 5s pós-ativação, utilizando 100 frames.

| | Volume | pH | CSPZ | Normais | MOT | VCL | VAP | VSL | STR | WOB | PROG | BCF | NSPZ |
|----------------|--------|---------|---------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|-------------|---------------|---------------|-------------|------|
| Volume | 1 | | | | | | | | | | | | |
| pH | 0,20 | 1* | | | | | | | | | | | |
| CSPZ | -0,14 | 0,05* | 1* | | | | | | | | | | |
| Normais | -0,26 | 0,29* | - 0,01* | 1* | | | | | | | | | |
| MOT | 0,16 | 0,02* | 0,14* | 0,70* | 1 | | | | | | | | |
| VCL | -0,01 | 0,27* | 0,15* | 0,50* | 0,73 | 1 | | | | | | | |
| VAP | -0,09 | 0,35* | 0,19* | 0,50* | 0,72 | 0,89 | 1 | | | | | | |
| VSL | -0,16 | 0,34* | 0,32* | 0,51* | 0,72 | 0,73 | 0,93 | 1* | | | | | |
| STR | -0,28 | 0,05* | 0,20* | 0,32* | 0,32 | 0,01 | - | - | 1 | | | | |
| WOB | -0,16 | 0,21* | 0,25* | 0,35* | 0,6 | - | - | 0,94* | 0,52 | 1* | | | |
| PROG | -0,17 | 0,31* | 0,29* | 0,50* | 0,71 | 0,72 | 0,92 | 0,99* | 0,64 | 0,96* | 1 | | |
| BCF | -0,02 | -0,20* | -0,04* | -0,23* | -0,54 | -0,86 | -0,79 | -0,49* | 0,24 | -0,44* | -0,46* | 1 | |
| NSPZ | -0,29 | - 0,07* | 0,06* | -0,50* | -0,78 | -0,76 | -0,63 | -0,49* | 0,02 | -0,41* | -0,49* | 0,64 | 1* |

Distribuição dos dados testada por Shapiro-Wilk, em caso de efeito o asterisco (*) indica o teste de correlação de Spearman. Valores em negrito e vermelho indicam $p < 0,05$ para os devidos testes de correlação. Volume de Sêmen (Volume). Potencial hidrogeniônico (pH). Concentração espermática (CSPZ). Células normais (Normais). Taxa de motilidade (MOT). Velocidade curvilinear (VCL). Velocidade média de deslocamento (VAP). Velocidade em linha reta (VSL). Retilinearidade (STR). Oscilação (WOB). Progressão (PROG). Frequência do batimento transposto (BCF). Número de espermatozoides (NSPZ).

De forma geral, é comum observar estudos científicos que relatam a motilidade e outros parâmetros espermáticos, entretanto, muitos destes trabalhos não destacam a partir de qual velocidade as células foram consideradas como móveis, isto acaba sendo um grande erro e fornece dados mascarados para o autor e ao leitor. Nesse sentido, compreender as velocidades mínimas das células é algo necessário e específico para cada espécie, sendo um fator de grande impacto nas análises espermáticas (WILSON-LEEDY; INGERMANN, 2007).

Para peixes é evidente que as velocidades dos espermatozoides é o principal determinante do sucesso da fertilização (GAGE, *et al.*, 2004). Nesse sentido, a classificação do movimento espermático realizada anteriormente estabeleceu as velocidades mínimas para os testes de combinações, compreendendo a diferença entre células estáticas que não apresentaram movimento progressivo e células lentas com pouco movimento, mas progressivo, alcançando as velocidades mínimas para considerar uma célula móvel para truta arco-íris, sendo elas VSL = 3, VAP = 6, VCL = 25 ($\mu\text{m/s}$).

Para validação da classificação das células nas categorias e a escolha das velocidades previamente testadas, os resultados calculados pelo Teorema de Pitágoras foram comparados com os resultados do próprio CASA, conforme metodologias descritas (SANCHES, *et al.*, 2010; 2013). Não se observou diferença significativa para a comparação de médias entre os métodos, indicando o alinhamento das duas formas de análise dentro da cinética espermática do nosso estudo e para nossa espécie. Destaca-se que este tipo de comparação é baseado nas próprias fórmulas que o software utiliza para gerar os resultados, mostrando, portanto, que o software realmente é confiável e preciso (VERSTEGEN, *et al.*, 2002), desde que seja ajustado corretamente para cada espécie alvo do estudo.

A máxima velocidade de uma célula entre os frames, parâmetro “d” no CASA/ImageJ, é centralizada nas trajetórias das células, uma vez que espermatozoides mais rápidos que o valor predefinido no software são excluídos na análise, podendo prejudicar o reconhecimento fiel das células no campo de visualização. Através da regressão segmentada com teste de breakpoint, ficou evidente que o valor a ser utilizado é 8, este que é indicado para uso em peixes (NEUMANN *et al.*, 2013) e já é predefinido nas configurações originais do software

para o zebra-fish (*Danio rerio*) (WILSON-LEEDY; INGERMANN, 2007). Contudo, para algumas espécies de peixes, verificam-se a utilização de cotas maiores para este parâmetro, como é o caso do *Steindachneridion parahybae* e *Rhamdia quelen* que utilizam, respectivamente, cotas de 15 e 12 pixels (SANCHES, *et al.*, 2010; 2013). Ou seja, são espécies que possuem células com trajetórias lineares e mais rápidas e necessitam de uma cota maior para reconhecer os espermatozoides no campo de visualização, diferente da truta arco-íris, que possui células com trajetórias circulares e mais lentas, exigindo uma cota menor em pixels.

A análise das imagens das trajetórias dos espermatozoides, com 25 e 100 frames em 5 e 10 segundos mostrou que realmente as configurações aplicadas antes foram contempladas durante a análise, uma vez que as células que saíram do campo de visualização, não foram consideradas, assim como as células determinadas como estáticas, ou seja, aprovando os passos e critérios seguidos até o momento, fornecendo valores reais do movimento espermático.

A quantidade de frames utilizada mostra que conforme mais frames (tempo de vídeo) são utilizados, os espermatozoides saem do campo de visualização e por consequência não são considerados na análise. Dessa forma, se as células rápidas saem do campo de visualização logo em 5 segundos e as lentas permanecem, o resultado encontrado não é fiel, gerando valores baixos de motilidade e velocidades. Nesse sentido, após a regressão segmentada com testes de breakpoint realizados anteriormente, podemos destacar que o valor de frames que melhor se enquadram para nossa espécie são 100 frames ou 1 segundo de vídeo, capturando o máximo de trajetória das células sem prejudicar a fidelidade dos resultados, valor este que é amplamente utilizado em pesquisas com peixes (BORYSHPOLETS, *et al.*, 2013; CALDEIRA e SOLER, 2018; CATTELAN e VALENZANO, 2025).

A partir da padronização concluída e as configurações testadas, procedeu-se à análise dos parâmetros espermáticos ao longo do tempo. Esta abordagem fornece uma descrição objetiva do comportamento dos espermatozoides no momento da ativação, permitindo-se inferir o potencial fertilizante com base na qualidade seminal. Conforme evidenciado por Kime *et al.* (2001), essa avaliação é fundamental para estimar a taxa de fertilização, uma vez que os parâmetros cinéticos espermáticos estão diretamente associados ao desempenho reprodutivo. Entretanto, alguns

trabalhos que visam a análise de sêmen computadorizada em peixes, iniciam as análises em cerca de 10 segundos pós-ativação (GALLEGO, *et al.*, 2017; SPICA, *et al.*, 2021) e é sabido que o movimento espermático possui uma queda brusca em poucos segundos após a ativação (BUTZGE, *et al.*, 2021), ou seja, quanto mais rápido for realizado o procedimento de ativação e início da gravação dos vídeos, os resultados são mais fiéis ao que ocorre na natureza.

Levando-se em consideração que em salmonídeos como a truta, o movimento espermático ocorre no máximo até 20-30 segundos em condições naturais (KIME, *et al.*, 2001; BUTZGE, *et al.*, 2021) se faz necessário o início da análise o mais rápido possível, portanto, no nosso estudo foi utilizada uma técnica (SANCHES *et al.*, 2010; 2013) que permite o início dos vídeos em 4 segundos, de forma que em 5 segundos já é possível realizar as análises de movimentação espermática, como realizado em outras pesquisas para a truta (JUDYCKA, *et al.*, 2019; DIETRICH, *et al.*, 2005; LAHNSTEINER, *et al.*, 1998). A partir disto, foi possível observar que em 10 segundos ocorre uma queda estatisticamente visível para os parâmetros de motilidade, velocidades, oscilação e progressão se comparado a 5s. Devido a redução do movimento, conforme se passam os segundos, as células permanecem no campo de visualização, observado pelo aumento do número de espermatozoides, do BCF e da retilinearidade, uma vez que as células que permanecem ainda se movimentam no próprio eixo, sem progressão.

Com relação aos parâmetros seminais e espermáticos submetidos a análise descritiva, verificou-se alinhamento positivo se comparado a outros estudos com esta espécie (RUSCO, *et al.*, 2021; KUTLUYER, *et al.*, 2014). Dentre as correlações encontradas para os parâmetros podemos destacar a quantidade de células Normais que apresentou correlação positiva com a taxa de motilidade, contudo, inversamente proporcional se comparado com NSPZ, ou seja, quanto mais células normais, melhor é a motilidade, em contrapartida, quanto menos células normais, menos espermatozoides são visualizados pelo programa.

Considerando que a motilidade junto às altas velocidades são marcadores correlacionados para sucesso da reprodução em peixes (LAHNSTEINER, *et al.*, 1998; KIME, *et al.*, 2001), os animais utilizados neste estudo respeitaram esta premissa, uma vez que MOT foi diretamente proporcional a VCL, VAP e VSL. Foi visualizado

uma ligação diretamente proporcional entre MOT, VCL, VAP e VSL quando correlacionadas com WOB e PROG, indicando que oscilação e progressão altas são reflexos de MOT e velocidades altas, por outro lado, se correlacionadas com NSPZ a correlação é fortemente negativa, desta forma, quanto mais espermatozoides no campo de visualização, menor serão as velocidades e taxa de motilidade. A frequência do batimento transposto (BFC) apresentou uma característica peculiar, onde a correlação foi negativa para a grande maioria dos parâmetros, indicando que valores altos de BCF, refletem em baixa qualidade espermática.

Em um contexto geral, foi possível realizar as análises espermáticas com êxito, atingindo uma configuração padronizada para a análise de sêmen da truta arco-íris após uma sequência de testes minuciosamente avaliados. Os resultados aqui encontrados não são definitivos, mas indicam um caminho assertivo para realizar tais análises com mais confiança, deixando uma base para novos estudos relacionados.

Destaca-se, que mais estudos neste sentido devem ser realizados de forma particular para cada espécie, ou seja, não é só utilizar o *plugin CASA* que está resolvido o problema, deve-se compreender o comportamento das células espermáticas de cada espécie de forma preliminar às análises experimentais, fornecendo dados reais e válidos na comunidade científica.

6. Conclusão

O software *ImageJ plugin CASA* pode ser utilizado com eficiência na análise espermática computadorizada de sêmen para a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*. Foi realizada a caracterização espermática com sucesso, indicando-se para avaliação dos espermatozoides uma taxa de captura de 100 frames (1s) de vídeo em 5s pós-ativação e para o reconhecimento partindo das células lentas, a combinação de VSL=3 $\mu\text{m/s}$, VAP=6 $\mu\text{m/s}$ e VCL=25 $\mu\text{m/s}$, obtendo assim resultados precisos. Para tanto, as configurações sugeridas devem ser utilizadas da seguinte forma na janela *ImageJ/plugins/Analyse/CASA/Sperm Tracker*: a=1, b=30, c=100, d=8, e=3, f=6, g=25, h=5, i=1, j=25, k=6, l=25 m=80, n=80, o=50, p=60, q=100, r=558.78, s=0 e t=0, com exceção do “r” (rever *item 3.2*).

7. Referências bibliográficas

ABAIGAIR, T.; BARBERTO, J.; HOLT, W. V. Trajectory variance and autocorrelations within single-sperm tracks as population-level descriptors of sperm track complexity, predictability, and energy-generating ability. **Journal of Andrology**, v. 33 (2), p. 208-216, 2012.

ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 166 – 172. 2003.

ARAÚJO, R. V. de; VIVEIROS, A. T. M.; TABATA, Y. A.; CÉSAR, M. P. Manejo reprodutivo da truta arco-íris em cativeiro. Lavras: UFLA, Ano XII, n. 131. **Boletim técnico**, 2006.

ARAÚJO, R. V. Motilidade, velocidade e fertilidade do sêmen de surubim-do-paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes) criopreservado em diferentes diluidores. Dissertação e Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

BARBOSA, A. S. Viabilidade econômica do sistema intensivo de produção de trutas na Serra Catarinense. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2014.

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **Journal of Experimental Zoology**, v. 261, p. 122-131, 1992.

BORYSHPOLETS, S.; KOWALSKI, R. K.; DIETRICH, G. J.; DZYYUBA, B.; CIERESZKO, A. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. **Theriogenology**, v. 80, n. 7, p. 758-765, 2013.

BUTZGE, A. J., YOSHINAGA, T. T., ACOSTA, O.D.M., FERNANDINO, J. I., SANCHES, E. A., TABATA, Y. A., de OLIVEIRA, C., TAKAHASHI, N. S., HATTORI, R. S. Early warming stress on Rainbow trout juveniles impairs male reproduction but contrastingly elicits intergenerational thermotolerance. **Scientific Reports** 11:17053, nature portfolio, 2021.

CALDEIRA, C. et al. Padronização da análise da motilidade espermática usando CASA-Mot para salmão do Atlântico (*Salmo salar*), enguia europeia (*Anguilla anguilla*) e esturjão siberiano (*Acipenser baerii*). **Aquaculture**, v. 502, p. 223-231, 2019.

CALDEIRA, C.; SOLER, C. Fish sperm assessment using software and cooling devices. **Journal of Visualized Experiments**, [S. l.], n. 137, e56823, 2018.

CAROSFELD, J., GODINHO, H. P., ZANIBONI, E., & HARVEY, B. J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Aquaculture**, v. 63, p. 472-489, 2003.

CATTELAN, S.; VALENZANO, D. R. Declínio dependente da idade na qualidade e função do esperma em um vertebrado naturalmente de vida curta. **BMC Ecology and Evolution**, v. 25, p. 2, 2025.

COSSON, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. **Journal of Fish Biology**, v. 76, n. 1, p. 240-279, 2010.

DIETRICH, G. J.; KOWALSKI, R.; WOJTCZAK, M.; DOBOSZ, S.; GORYCZKO, K.; CIERESZKO, A. Motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to sequential collection of milt, time of post-mortem storage and anesthesia. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 31, p. 1-9, 2005.

FAO. *Oncorhynchus mykiss*. Programa de Informação sobre Espécies Aquáticas Cultivadas. Texto de Cowx, I. G. **Divisão de Pesca e Aquicultura**. Roma, 2023.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. **Towards Blue Transformation**. Rome, FAO, 2022.

FARIA, A. O atual desenvolvimento da criação de trutas na Serra da Bocaina. Rio de Janeiro: MA/DNPA, p.37-39, 1953.

FOGLI DA SILVEIRA, W., KAVAMOTO, E. T., RIGOLINO, M. G., & TABATA, Y. A. Fertilidade do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus gibbons*, em diferentes concentrações de espermatozóides por óvulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 15, p. 51-54, 1988.

GAGE, M.J.G., MACFARLANE, C.P., YEATES, S., WARD, R.G., SEARLE, J.B. and PARKER, G.A. Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon:

Relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. **Current biology**, v. 14, p. 44–47, 2004.

GALLEGO, V.; CAVALCANTE, S. S.; FUJIMOTO, R. Y.; CARNEIRO, P. C. F.; AZEVEDO, H. C.; MARIA, A. N. Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Theriogenology**, v. 87, p. 16-24, 2017.

JUDYCKA, Sylwia; NYNCA, Joanna; LISZEWSKA, Ewa; MOSTEK, Agnieszka; CIERESZKO, Andrzej. Comparative analysis of sperm freezability of sex-reversed female brook trout and sex-reversed female rainbow trout semen. **Aquaculture**, v. 498, p. 201-207, 2019.

KIME, D. E.; VAN LOOK, K. J. W.; MCALLISTER B. G.; HUYSKENS, G.; RURANGWA E.; OLLEVIER, F. Análise de esperma assistida por computador (CASA) como uma ferramenta para monitorar a qualidade do esperma em peixes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 130, n. 4, p. 425-433, 2001.

KUTLUYER, Filiz; KAYIM, Murathan; ÖĞRETMEN, Fatih; BÜYÜKLEBLEBICI, Serhat; TUNCER, P. Barbaros. Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: Effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. **Cryobiology**, v. 69, n. 3, p. 462-466, 2014.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. **Aquaculture**, v. 163, p. 163-181, 1998.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. Physiological and biochemical determination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, semen quality for cryopreservation. *Journal of Applied Aquaculture*, v. 6, p. 47-73, 1996.

NEUMANN, G.; BOMBARDILLI, R.A.; SANCHES, E.A.; TOLEDO, C.P.R. Análise espermática computadorizada em peixes de água doce: procedimentos para uso do aplicativo CASA em software livre. Toledo, PR: Os autores. 86 p, 2013. ISBN 978-85-603-0840-8.

NEUMANN, G.; JÚNIOR, B. J.J.; NEUMANN, V.; BOMBARDELLI, R. A. Comparing accuracy of fish sperm motility measurements obtained from two computational extremes in tracking approaches: Nearest neighbor and multiple hypothesis tracking. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 56, n. 6, p. 829-836, 2021.

NEUMANN, G.; SANCHES, P. V.; BOMBARDELLI, R. A. Effects on fertility of motile sperm to egg ratio with use of cryopreserved *Rhamdia quelen* semen at different post-activation times. **Animal Reproduction Science**, v. 201, p. 84-92, 2019.

PASCUAL, M. et al. First documented case of anadromy in a population of introduced rainbow trout in Patagonia, Argentina. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 130, p. 53-67, 2001.

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G.; FORESTI, F. Analysis of NOR distribution in cultivated and naturalized stocks of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Genetics and molecular biology**, v. 25, p. 409-412, 2002.

PURCHASE, C. F.; EARLE, P. T. Modifications to the ImageJ computer-assisted sperm analysis plugin greatly improve efficiency and fundamentally alter the scope of attainable data. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 28, p. 1013-1016, 2012.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TABATA, Y. A.; EIRAS, A. C. Hematologia comparada entre diplóides e triplóides de truta arco-íris, Walbaum (Pisces, *Salmonidae*). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 4, p. 1093-1102, 1998.

ROMAGOSA, E., SOUZA, B. E., SANCHES, E. A., BAGGIO, D. M., & BOMBARDELLI, R. A. Sperm motility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the activating medium. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 678-681, 2010.

RURANGWA, E., KIME, D. E., OLLEVIER, F., & NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v. 234, p. 1-28, 2004.

RURANGWA, E., ROELANTS, I., HUYSKENS, G., EBRAHIMI, M., KIME, D. E., & OLLEVIER, F. The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial

insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. **Aquaculture**, v. 53, p.402-413, 1998.

RURANGWA, E., VOLCKAERT, F. A. M., HUYSKENS, G., KIME, D. E., & OLLEVIER, F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture**, v. 55, p. 751-769, 2001.

RUSCO, G.; DI IORIO M.; IAMPIETRO R.; RONCARATI, A.; ESPOSITO S.; IAFFALDANO, N. Cryobank of Mediterranean brown trout semen: evaluation of the use of frozen semen up to six hours post-collection. **Fishes**, v. 6, n. 3, p. 26, 2021.

SANCHES, E. A., BOMBARDELLI, R. A., BAGGIO, D. M., & SOUZA, B. E. Insemination dose for artificial fertilization of dourado oocytes. Revista Brasileira De Zootecnia - **Brazilian Journal of Animal Science**, v. 38, p. 2091-2098, 2009.

SANCHES, E. A., BOMBARDELLI, R. A., MARCOS, R. M., NEUMANN, G., DE TOLEDO, C. P. R., & ROMAGOSA, E. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. **Aquaculture Research**, v.42, p.153-156, 2010.

SANCHES, E. A., MARCOS, R. M., BAGGIO, D. M., TESSARO, L., BALEN, R. E., BOMBARDELLI, R. A. Sperm concentration estimate of fish semen using spermatocrit method. **Aquaculture**, v.40, p. 1163-1167, 2011.

SANCHES, E. A., MARCOS, R. M., R. Y. OKAWARA, R. Y., CANEPPELE, R. D., BOMBARDELLI, A., ROMAGOSA, E. Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 29, p. 1114-1122, 2013.

SANCHES, E. A.; OKAWARA, R.Y.; CANEPPELE, D.; TOLEDO, R. C. P.; BOMBARDELLI, R. A.; ROMAGOSA, E. Sperm characteristics of *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) throughout 112 hours of storage at four temperatures. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 31, p. 79-88, 2015.

SATO, G. S.; TABARA, Y. A.; TAKAHASHI, N. S. Truta de Campos de Jordão, valorização do produto local através da indicação geográfica do turismo e da gastronomia. **Informações Econômicas**, SP, v. 41, n. 3, p. 68-77, 2011.

SCHINDELIN, J. E.; RUEDEN, C. T.; HINER, M. C.; ELICEIRI, K. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 82, p. 518–529, 2015

SOUZA, A. R. S. Protocolo de criopreservação espermática de pacu *Piaractus mesopotamicus* utilizando diferentes soluções crioprotetoras. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista – UNESP, Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, Jaboticabal, 2022.

SPICA, L. N.; SANCHES, E. A.; STREIT JUNIOR, D. P.; CORRÊA FILHO, R. A. C.; BRASILEIRO, L. de O.; RODRIGUES, R. B.; KASAI, R. Y. D.; POVH, J. A. Successive seminal collections from *Leiarius marmoratus* during the reproductive period. **Animal Reproduction Science**, v. 234, p. 106852, 2021.

TABATA, Y. A. Criação de truta arco-íris. 2006. Disponível em: http://www.infobibos.com.br/Artigos/2006_2/Truta/Index.htm. Acesso em: 02/09/2023.

TABATA, Y. A.; PORTZ, L. Truticultura em clima tropical. **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. São Paulo: TecArt**, p. 307-341, 2004.

TVEDT, HARALD B. *et al.* The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. **Aquaculture**, v. 194, n. 1-2, p. 191-200, 2001.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.

VIVEIROS, A. T. M., & GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 137-150, 2009.

WHO. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen, six edition. **World Health Organization**. 2021.

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**, v. 67, p. 661-67, 2007.

WILSON-LEEDY, J. G.; INGERMANN, R. L. Manual for CASA plugin for ImageJ.
2006. Disponível em: < <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/docs/CASAIstructions.pdf>>.
Acesso em: 29/09/2023