

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
PESQUEIROS E ENGENHARIA DE PESCA

GIOVANO NEUMANN

Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) em software livre empregado em análises espermáticas de peixes: cientometria e aplicação em rotina de reprodução artificial

TOLEDO

2015

GIOVANO NEUMANN

Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) em *software* livre empregado
em análises espermáticas de peixes: cientometria e aplicação em rotina de
reprodução artificial

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vanderlei Sanches
Coorientador: Prof. Dr. Robie Allan
Bombardelli

TOLEDO

2015

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária
UNIOESTE/Campus de Toledo.

Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

N491c Neumann, Giovano
Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) em software livre
empregado em análises espermáticas de peixes : cientometria e
aplicação em rotina de reprodução artificial / Giovano Neumann. --
Toledo, PR : [s. n.], 2015.
58 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vanderlei Sanches

Coorientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de
Pesca) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus de
Toledo. Centro de Engenharias e Ciências Exatas.

1. Peixes – Fertilização artificial 2. Inseminação artificial animal
3. Sêmen - Criopreservação 4. Espermatogenese em animais 5.
Avaliação espermática computadorizada 6. CASA (Computer
Assisted Spermn Analysis) 7. Produção científica - Indicadores 8.
Cientometria I. Sanches, Paulo Vanderlei, orient. II. Bombardelli,
Robie Allan, orient. III. T

CDD 20. ed. 639.31

FOLHA DE APROVAÇÃO

“Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) em software livre empregado em análises espermáticas de peixes: cientometria e aplicação em rotina de reprodução artificial.”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, pela Comissão Examinadora composta pelos membros:

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Paulo Vanderlei Sanches
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)



Prof. Dr. Gilmar Baumgartner
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Prof. Dr. Marcos Weingartner
Universidade Federal da Fronteira Sul

Aprovada em: 27 de fevereiro de 2015, 14hs.

Local de defesa: Miniauditório do Gerpel – UNIOESTE/campus de Toledo.

DEDICATÓRIA

Ao laboratório Latraac

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu o desenvolvimento e conclusão do mestrado e da dissertação;

A minha esposa Silvia pelo incentivo, apoio e compreensão;

À “família Latraac” em especial a equipe de trabalho: Cíntia Nara Buratto (Pará), Cesar Pereira Rebechi de Toledo (Césão), Rogério Anderson Druzian (Bangu), Mauricio Spagnolo Adames e Alexandre Henrique Buzzi, que me ajudaram durante todo o experimento;

Aos amigos Vitor Sendin Magalhães e Fabricio Almeida pelo incentivo e apoio durante o desenvolver do ensaio experimental;

Ao Prof. Dr. Pitágoras Augusto Piana pela orientação no início do trabalho de cientometria;

Ao Prof. Dr. Paulo Vanderlei Sanches pela orientação;

Ao Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli pela dedicada coorientação. Por deixar eu fazer esses ensaios mesmo eu não sabendo me expressar sobre o que eu queria testar, por aguentar os meus erros e vícios de português, pelos conselhos pessoais e profissionais e por garantir suporte com equipamentos, materiais e animais. E por corrigir inúmeras vezes os textos;

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná e ao Programa de pós Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca (PREP);

A CAPES, coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior, pela concessão da bolsa de estudos;

Por fim, a todos os que passaram em minha vida nesses dois anos...

Muito Obrigado.

Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) em software livre empregado em análises espermáticas de peixes: ciëntometria e aplicação em rotina de reprodução artificial

RESUMO

Esta dissertação baseia-se na elaboração de dois artigos científicos distintos. (1) Primeiro artigo trata-se de uma análise ciëntométrica: Em 2007 foi lançado no meio científico por Wilson-Leedy e Ingermann, o primeiro artigo utilizando o CASA em *software* livre em análise de mobilidade espermática para peixes, para este estudo, a partir de técnicas ciëntométricas, foi avaliado a contribuição e o impacto que o artigo provocou na comunidade científica. Também foi avaliada a frequência no número de publicações utilizando análises andrológicas em peixes, desde 2007 à 2014 em quatro revistas que publicam artigos referentes a este tema. Foram avaliados sob artigos que realizaram análise andrológica em peixes utilizando algum sistema CASA existente, as variáveis utilizadas e as formas de interpretação dos resultados para determinar a viabilidade espermática e correlacionar os parâmetros de movimento espermático com o potencial de fertilização. Para a ciëntometria da contribuição do lançamento do CASA em *software* livre foi realizada busca no *google acadêmico* para levantar todos os trabalhos que haviam citado o artigo. Para a ciëntometria dos artigos com peixes utilizando o CASA, foi realizado busca utilizando o indexador da *ScienceDirect*. E para avaliar as variáveis e as interpretações realizadas pelos autores, colhemos suas características dos materiais e métodos e resultados nos artigos. Encontrou-se 123 citações do artigo de Wilson-Leedy e Ingermann destes, 94 são artigos, dos quais 66 foram realizados com peixes e, 35 destes realizaram suas pesquisas utilizando o CASA em *software* livre, e ocorreu um aumento de 85% nas publicações citando o autor referência. Na busca de artigos que utilizam análise andrológica em peixes, ocorreu um aumento de 59,4% das publicações de 2007 à 2014. Dos artigos que utilizam qualquer sistema CASA para a avaliação da mobilidade espermática em peixes, 75,76% dos trabalhos avalia dois ou mais tempos do movimento espermático, 51,52% utiliza pelo menos quatro das características geradas pelo CASA, aproximadamente $\frac{1}{4}$ dos trabalhos validou os resultados do CASA com fertilização ou eclosão dos ovos e usou modelos estatísticos para agrupar as variáveis correlacionadas do CASA e explica-las, menos de 10% dos artigos explora modelagem estatística na cinética espermática e para explicar as características gerados pelo CASA sobre a fertilidade espermática. O artigo de Wilson-Leedy e Ingermann contribuiu para o avanço das pesquisas com espermatozoides de peixes, e foi utilizado na avaliação espermática de outros animais e outras células, também concluímos que pouco se sabe da relação de algumas variáveis espermáticas geradas pelo CASA com a fertilidade espermática em peixes. E que os pesquisadores não utilizam em sua totalidade os recursos do sistema CASA. (2) Segundo artigo trata-se de um experimento de reprodução artificial: O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos interativos ou independentes da relação espermatozoides móveis:ovócito e da velocidade espermática em procedimentos de reprodução artificial com o uso do sêmen do jundiá (*Rhamdia quelen*) criopreservado. Através do *Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)* foram avaliadas em seis réplicas a motilidade e a velocidade espermática do sêmen criopreservado a partir de oito segundos da sua ativação e a cada um segundo até o término do movimento espermático. Para o ensaio de fertilização foi aplicado um delineamento experimental em esquema fatorial (6 x 3) composto de seis relações espermatozoides móveis:ovócito (70.000, 90.000, 110.000, 130.000, 150.000 e 170.000), três

velocidades espermáticas (60, 40 e 20 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) e três réplicas ou blocos experimentais (*pools* de ovócitos provenientes de três grupos de fêmeas). As curvas de ativação dos espermatozoides (cinéticas) foram elaboradas com auxílio de modelo estatístico não linear. Os efeitos foram avaliados sobre as taxas de fertilização, eclosão e larvas normais. Na avaliação das variáveis, a análise de superfície de resposta não mostrou efeito interativo ($p>0,05$) entre a relação espermatozoides móveis:ovócito e as velocidades espermáticas, sobre as taxas de fertilização, de eclosão e de larvas normais. Somente foi encontrado efeito linear ($p<0,05$) da velocidade espermática sob as taxas de fertilização e de eclosão dos ovos. De acordo com os resultados, conclui-se que não há diferença alguma entre uso de 70.000 até 170.000 espermatozoides móveis para cada ovócito sobre o sucesso reprodutivo em termos de taxa de fertilização, eclosão dos ovos e normalidade larval do jundiá (*Rhamdia quelen*) e, que o valor da velocidade espermática é determinante sobre o sucesso reprodutivo dos espermatozoides de jundiá (*Rhamdia quelen*) diminuindo as taxas de fertilização e eclosão conforme diminui a velocidade espermática.

Palavras-chave: criopreservação, dose inseminante, espermatozoides, sêmen, velocidade espermática.

Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) in free software employed in fish sperm analysis: scientometrics and application in routine artificial reproduction

ABSTRACT

This dissertation is based on the development of two separate scientific papers. (1) First article it is a scientometric analysis: In 2007 was released in the scientific means by Wilson-Leedy and Ingermann, the first article using the CASA free software in sperm mobility analysis for fish, for this study, from of scientometric techniques, the contribution has been assessed and the impact that the article caused the scientific community. It also evaluated the frequency in the number of publications using andrologic analysis in fish, from 2007 to 2014 in four magazines that publish articles related to this topic. Were evaluated under articles made soundness analysis in fish using any existing CASA system, the variables used and ways to interpret the results to determine the sperm viability and correlate the sperm motion parameters with the potential fertilization. For scientometry CASA launching the contribution in free software took place in the google scholar search to get all the work that had quoted the article. For scientometry of items with fish using CASA, was conducted using the search index of ScienceDirect. And to assess the variables and the interpretations made by the authors, harvest characteristics of the materials and methods and results in the articles. It was found 123 quotes Wilson-Leedy article and Ingermann these, 94 are articles, of which 66 were performed with fish, and 35 of these conducted their research using CASA in free software, and there was an increase of 85% in citing publications the author reference. In the search for articles that use in fish soundness analysis, an increase of 59.4% from 2007 to 2014. Of the publications articles using any home system for the assessment of sperm motility in fish, 75.76% of the two work assesses or more times the spermatic movement, 51.52% use at least four of the characteristics generated by CASA, about $\frac{1}{4}$ of the work validated the CASA results with fertilization and hatching of eggs and used statistical models to group correlated variables CASA and explanations them, less than 10% of articles explores statistical modeling in sperm kinetics and to explain the characteristics generated by CASA on sperm fertility. The article by Wilson-Leedy and Ingermann contributed to the advancement of research with fish sperm, and sperm was used in the evaluation of other animals and other cells also concluded that little is known of the relationship of some sperm variables generated by CASA with fertility sperm in fish. And the researchers do not use in full the resources of the CASA system. (2) According to an article this is an experiment of artificial reproduction: The objective of this study was to evaluate the interactive effects of the relationship or independent mobile sperm: oocyte and sperm speed on artificial reproduction procedures with the use of semen catfish (*Rhamdia quelen*) cryopreserved. Through the Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) were evaluated in six replicates motility and sperm velocity of cryopreserved semen from eight seconds of its activation and to each according to the end of the spermatic movement. For the fertilization test an experimental design was used in a factorial (6x3x3) consists of six mobile sperm relations: oocyte (70,000, 90,000, 110,000, 130,000, 150,000 and 170,000), three sperm speeds (60, 40 and $20\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) and three experimental replicates or blocks (pools of oocytes from three groups of female). Activation curves of sperm (kinetic) have been prepared with the help of non-linear statistical model. The effects were evaluated on the fertilization, hatching and

normal larvae. In evaluating the variables, the response surface analysis showed no interaction effect ($p>0.05$) between the relationship moving sperm: oocyte and sperm speed, on the fertilization rates, hatching and normal larvae. Only linear effect was found ($p<0.05$) of sperm speed under the fertilization rates and hatching eggs. According to the results, it is concluded that there is no difference between the use of 70,000 up to 170,000 mobile sperm for each oocyte on the reproductive success in terms of fertilization rate, hatching and larval normality of catfish (*Rhamdia quelen*) and that the value of the sperm velocity is decisive on the reproductive success of sperm catfish (*Rhamdia quelen*) decreasing the fertilization and hatching rates as decreases sperm speed.

Keywords: cryopreservation, insemination dose, semen, sperm speed, spermatozoa.

SUMÁRIO

CAPITULO I.....	12
Revisão de literatura.....	12
1. Breve histórico do CASA	13
2. A ferramenta CASA na análise andrológica em peixes	13
3. Relação espermatozoide:ovócito.....	14
4. A velocidade espermática	14
5. Referências.....	15
CAPITULO II: ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	18
Artigo I: Análise cientométrica do uso do sistema CASA em peixes: evolução do <i>software</i> livre, processamento e interpretação dos dados.....	19
Resumo.....	20
1. Introdução	21
2. Materiais e Métodos.....	22
3. Resultados	24
4. Discussão	27
5. Conclusão.....	30
6. Referências.....	30
Artigo II: Efeitos da velocidade espermática e da relação espermatozoides móveis:ovócito sobre o sucesso reprodutivo do jundiá cinza (<i>Rhamdia quelen</i>).....	34
Resumo.....	35
7. Introdução	36
8. Materiais e Métodos.....	37
9. Resultados	41
10.Discussão	44
11.Conclusão.....	47
12.Referências.....	47
13.Considerações finais	52
14.Apêndices.....	53

CAPITULO I

Revisão de literatura

1. Breve histórico do CASA

Por volta de 1940 iniciaram-se as primeiras gravações do movimento espermático, utilizando as tecnologias eletrônicas disponíveis na época, com o uso de dispositivos de gravação de vídeo. A partir de 1970 com a evolução dos computadores digitais programáveis, os biólogos e espermatozologistas vislumbraram a possibilidade do uso desta tecnologia para quantificar o movimento de organismos microscópicos, incluindo os espermatozoides (Amann e Waberski, 2014; Amann e Katz, 2004).

Iniciando em 1974 e concluindo em 1975, foi desenvolvido o primeiro sistema de análise espermática assistida por computador (CASA) para emprego em animais mamíferos, a partir do qual evoluiu para um sistema totalmente automatizado (Amann e Waberski, 2014). Após, o sistema foi incrementado para outros fins, e avaliação de outras células (Amann e Waberski, 2014), e corrigido as suas falhas.

Um estudo pioneiro, que empregou conceitos do sistema CASA, aplicado a espermatozoides de peixes foi publicado em 1995 por Perchec e colaboradores (Perchec *et al.*, 1995) quando avaliaram as relações entre o conteúdo de ATP e a motilidade espermática em carpa.

Apesar do sistema CASA ter sido projetado para realizar avaliações objetivas e repetíveis, o usuário deve ter cautela durante a realização das análises e na interpretação dos resultados, pois as configurações do *software* e as condições inadequadas para obtenção das imagens podem frequentemente levar a erros (Boryshpolets *et al.*, 2013; Gallego *et al.*, 2013).

Outra característica que leva a grandes discrepâncias entre os resultados gerados para as mesmas espécies e por diferentes pesquisadores é o uso de um sistema CASA diferente, já que existem atualmente 12 diferentes sistemas CASA disponíveis (Fauvel, Suquet e Cosson, 2010).

2. A ferramenta CASA na análise andrológica em peixes

Resumidamente, o sistema CASA avalia as características de mobilidade espermática, utilizando uma série de imagens sobrepostas a partir de um vídeo do movimento espermático, o *software* do sistema utiliza o ponto central da cabeça de cada espermatozoide para reconstruir a trajetória individual dos espermatozoides (Abaigar, Bardero e Holt, 2012).

O CASA pode apresentar os dados das características dos espermatozoides com os valores médios das variáveis avaliadas para todos os espermatozoides que permaneceram no campo do vídeo durante o intervalo avaliado (Abaigar, Bardero e Holt, 2012), ou apresentar as características individuais de cada espermatozoide (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007).

3. Relação espermatozoide:ovócito

A relação espermatozoide:ovo ou dose inseminante mínima ideal, pode ser definida como o número de espermatozoides necessários para fertilizar cada ovo, representando o máximo sucesso na fertilização artificial (Leite *et al.*, 2013; Grubert *et al.*, 2005). Essa proporção ideal de gametas é espécie-específica e está relacionada às características específicas da espécie e do ambiente fertilizante, como o diâmetro do ovo hidratado (Huchette *et al.*, 2004), a taxa de motilidade (Cosson *et al.*, 2008), a velocidade espermática ou a distância percorrida pelos espermatozoides (Gasparini *et al.*, 2010; Gage *et al.*, 2004), o tempo de duração da motilidade espermática (Cosson *et al.*, 2008), a taxa de decréscimo da motilidade e da velocidade espermática (Adames, 2014; Kalbassi, Lorestani e Maramazi, 2013), o tempo de contato entre os gametas (Grubert *et al.*, 2005), o fator diluição dos gametas (Linhart *et al.*, 2008), e a temperatura dos gametas e da solução ativadora (Mehlis e Bakker, 2014; Sanches *et al.*, 2011).

A aplicação do conceito de dose inseminante em procedimentos de fertilização artificial é fundamental para a obtenção de sucesso nas taxas de fertilização, pois o emprego de um número excessivo de espermatozoides nestes procedimentos pode induzir à polispermia. Além disso, o emprego de reduzidas doses inseminantes ou relações espermatozoides:ovo pode reduzir a probabilidade de encontro de gametas, e da mesma forma prejudicar o processo de fertilização artificial (Shimoda *et al.*, 2007).

4. A velocidade espermática

A velocidade dos espermatozoides é amplamente utilizadas para avaliar os efeitos do processamento do sêmen sobre a viabilidade e a fertilidade das células espermáticas (Viveiros *et al.*, 2010). Nas rotinas de avaliação andrológica, o emprego de técnicas de análise espermática computadorizada (CASA) (Amann e Waberski, 2014) permite a obtenção de diversas variáveis espermáticas, as quais permitem a interpretação do comportamento do movimento espermático e dos efeitos das variáveis que interferem sobre este processo (Bobe e Labbé, 2010).

A viabilidade e a fertilidade dos espermatozoide têm sido estimadas por meio de diversas variáveis. Dentre estas, a velocidade espermática está diretamente relacionada à fertilização dos ovos, uma vez que os espermatozoides velozes apresentam maiores chances de alcançar os ovócitos e concluir o processo de fertilização (Gasparini *et al.*, 2010; Liljedär *et al.*, 2008; Gage *et al.*, 2004; Burness *et al.*, 2004).

Além da velocidade (Gage *et al.*, 2004; Liljedär *et al.*, 2008; Viveiros *et al.*, 2010), o número de espermatozoides (Stoltz e Neff, 2006; Boschetto *et al.*, 2011) e a longevidade do

movimento espermático (Morita *et al.*, 2014) podem interferir de forma independente ou conjunta com a velocidade espermática sobre o encontro dos gametas. Pesquisas relacionadas a este tema, sugerem a ocorrência de competição entre espermatozoides de diferentes machos de fecundação externa, os autores apontam o sucesso na competição espermática à velocidade espermática diferenciada, por favorecer a fertilização pelos espermatozoides mais rápidos no salmão selvagem do Atlântico (*Salmo salar*) (Gage *et al.*, 2004), no salmão do ártico (*Salvelinus alpinus*) (Liljedär *et al.*, 2008) e no bluegill (*Lepomis macrochirus*) (Burness *et al.*, 2004).

5. Referências

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

Adames, M. S. 2014. Otimização da relação espermatozoide:ovócito empregando-se a frutose como modulador do movimento espermático em *Rhamdia quelen*. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca). Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 35p.

Amann, R. P.; Katz, D. F. 2004. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*. 25(3), 317-325.

Amann, R. P.; Waberski, D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*. 81, 5-17.

Bobé, J.; Labbé, C. 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*. 165, 535-548.

Boryshpolets, S.; Kowalski, R. K.; Dietrich, G. J.; Dzyuba, B.; Ciereszko, A. 2013. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology*. 80, 758-765.

Boschetto, C.; Gasparini, C.; Pilastro, A. 2011. Sperm number and velocity affect sperm competition success in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 65, 813-821.

Burness, G.; Casselman, S. J.; Schulte-Hostedde, A. I.; Moyer, C. D.; Montgomerie, R. 2004. Sperm swimming speed and energetics vary with sperm competition risk in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Behav Ecol. Sociobiol*. 56, 65-70.

Cosson, J.; Groison, A. -L.; Suquet, M.; Fauvel, C.; Dreanno, C.; Billard, R. 2008. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. *J. Appl. Ichthyol*. 24, 460-486.

Fauvel, C.; Suquet, M.; Cosson, J. 2010. Evaluation of fish sperm quality. *Journal of Applied Ichthyology*. 26, 636-643.

- Gage, M. J. G.; Macfarlane, C. P.; Yeates, S.; Ward, R. G.; Searle, J. B.; Parker, G. A. 2004. Spermatozoal Traits and Sperm Competition in Atlantic Salmon: Relative Sperm Velocity is the Primary Determinant of Fertilization Success. *Current Biology*. 14, 44-47.
- Gallego, V.; Pérez, L.; Asturiano, J. F.; Yoshida, M. 2013. Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). *Aquaculture*. 416-417, 238-243.
- Gasparini, C.; Simmons, L. W.; Beveridge, M.; Evans, J. P. 2010. Sperm Swimming Velocity Predicts Competitive Fertilization Success in the Green Swordtail *Xiphophorus helleri*. *Plos One*. 5(8), e12146.
- Grubert, M. A.; Mundy, C. N.; Ritar, A. J. 2005. The effects of sperm density and gamete contact time on the fertilization success of Blacklip (*Haliotis rubra*; Leach, 1814) and Greenlip (*H. Laevigata*; Donovan, 1808) Abalone. *Journal of Shellfish Research*. 24(2), 407-413.
- Huchette, S. M. H.; Soulard, J. P.; Koh, C. S.; Day, R. W. 2004. Maternal variability in the blacklip abalone, *Haliotis rubra* leach (Mollusca: Gastropoda): effect of egg size on fertilization success. *Aquaculture*. 231, 181-195.
- Kalbassi, M. R.; Lorestani, R.; Maramazi, J. 2013. Analysis of saline activator solution effects on sperm quality indices of *Barbus sharpeyi* by Image J software. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 12(2), 357-377.
- Kwantong, S.; Bart, A. N. 2009. Fertilization efficiency of cryopreserved sperm from striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage). *Aquac res*. 40, 292-97.
- Leite, L. V.; Melo, M. A. P.; Oliveira, F. C. E.; Pinheiro, J. C. S.; Campello, C. C.; Nunes, J. F.; Salmito-Vanderley, C. S. B. 2013. Determinação da dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Arq Bras Med Vet Zootec* 65(2), 421-29.
- Linhart, O.; Alavi, S. M. H.; Rodina, M.; Gela, D.; Cosso, J. 2008. Comparison of sperm velocity, motility and fertilizing ability between firstly and secondly activated spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*). *J. Appl. Ichthyol*. 24, 386-392.
- Liljedal, S.; Rudolfsen, G.; Folstad, I. 2008. Factors predicting male fertilization success in na external fertilizer. *Behav. Ecol. Sociobiol*. 62, 1805-1811.
- Mehlis, M. e Bakker, T. C. M. 2014. The influence of ambiente water temperature on sperm performance and fertilization success in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Evol. Ecol*. 28, 655-667.
- Morita, M.; Awata, S.; Yorifuji, M.; Ota, K.; Kohda, M.; Ochi, H. 2014. Bower-building behaviour is associated with increased sperm longevity in Tanganyikan cichlids. *Journal of Evolutionary Biology*. 27, 2629-2643.
- Perchec, G.; Jeulin, C.; Cosson, J.; André, F.; Billard, R. 1995. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science*. 108, 747-753.

- Sanches, E. A.; Neumann, G.; Baggio, D. M.; Bombardelli, R. A.; Piana, P. A.; Romagosa, E. 2011. Time and temperature on the storage of oocytes from jundiá catfish, *Rhamdia quelen*. 319, 453-458.
- Shimoda, E.; Andrade, D. R.; Vidal Júnior, M. V.; Godinho, H. P.; Yasui, G. S. 2007. Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae). Arq Bras Med Vet Zootec. 59(4), 877-82.
- Stoltz, J. A.; Neff, B. D. 2006. Sperm competition in a fish with external fertilization: the contribution of sperm number, speed and length. Journal Compilation. European Society for Evolutionary Biology. 19, 1873-1881.
- Viveiros, A. T. M.; Nascimento, A. F.; Orfão, L. H.; Isaú, Z. A. 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. Theriogenology. 74, 551-556.
- Wilson-Leedy, J. G.; Ingermann, R. L. 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. Theriogenology. 67, 661-672.

CAPITULO II: ARTIGOS CIENTÍFICOS

**Artigo I: Análise cientométrica do uso do sistema CASA em peixes:
evolução do *software* livre, processamento e interpretação dos
dados**

Preparado de acordo com as normas da revista *Journal of Informetrics*.

Resumo

Em 2007 foi lançado no meio científico por Wilson-Leedy e Ingermann, o primeiro artigo utilizando o CASA em *software* livre em análise de mobilidade espermática para peixes, para este estudo, a partir de técnicas cientométricas, foi avaliada a contribuição e o impacto que o artigo provocou na comunidade científica. Também foi avaliada a frequência no número de publicações utilizando análises andrológicas em peixes, desde 2007 à 2014 em quatro revistas que publicam artigos referentes a este tema. Foram avaliados sob artigos que realizaram análise andrológica em peixes utilizando algum sistema CASA existente, as variáveis utilizadas e as formas de interpretação dos resultados para determinar a viabilidade espermática e correlacionar os parâmetros de movimento espermático com o potencial de fertilização. Para a cientometria da contribuição do lançamento do CASA em *software* livre foi realizada busca no *google* acadêmico para levantar todos os trabalhos que haviam citado o artigo. Para a cientometria dos artigos com peixes utilizando o CASA, foi realizada busca utilizando o indexador da “*ScienceDirect*”. E para avaliar as variáveis e as interpretações realizadas pelos autores, colhemos suas características dos materiais e métodos e resultados nos artigos. Encontrou-se 123 citações do artigo de Wilson-Leedy e Ingermann destes, 94 são artigos, dos quais 66 foram realizados com peixes e, 35 destes realizaram suas pesquisas utilizando o CASA em *software* livre, e ocorreu um aumento de 85% nas publicações citando o autor referência. Na busca de artigos que utilizam análise andrológica em peixes, ocorreu um aumento de 59,4% das publicações de 2007 à 2014. Dos artigos que utilizam qualquer sistema CASA para a avaliação da mobilidade espermática em peixes, 75,76% dos trabalhos avalia dois ou mais tempos do movimento espermático, 51,52% utiliza pelo menos quatro das características geradas pelo CASA, aproximadamente $\frac{1}{4}$ dos trabalhos validou os resultados do CASA com fertilização ou eclosão dos ovos e usou modelos estatísticos para agrupar as variáveis correlacionadas do CASA e explica-las, menos de 10% dos artigos explora modelagem estatística na cinética espermática e para explicar as características gerados pelo CASA sobre a fertilidade espermática. O artigo de Wilson-Leedy e Ingermann contribuiu para o avanço das pesquisas com espermatozoides de peixes, e foi utilizado na avaliação espermática de outros animais e outras células, também concluímos que pouco se sabe da relação de algumas variáveis espermáticas geradas pelo CASA com a fertilidade espermática em peixes. E que os pesquisadores não utilizam em sua totalidade os recursos do sistema CASA.

Keywords: Wilson-Leedy e Ingermann, espermatozoide, sêmen de peixe

1. Introdução

Por volta de 1940 iniciaram-se as primeiras gravações do movimento espermático, utilizando as tecnologias eletrônicas disponíveis na época, com o uso de dispositivos de gravação de vídeo. A partir de 1970 com a evolução dos computadores digitais programáveis, os biólogos e espermatologistas vislumbraram a possibilidade do uso desta tecnologia para quantificar o movimento de organismos microscópicos, incluindo os espermatozoides (Amann e Waberski, 2014; Amann e Katz, 2004).

Iniciando em 1974 e concluindo em 1975, foi desenvolvido o primeiro sistema de análise espermática assistida por computador (CASA) para emprego em animais mamíferos, a partir do qual evoluiu para um sistema totalmente automatizado (Amann e Waberski, 2014). Após, o sistema foi incrementado para outros fins, e avaliação de outras células (Amann e Waberski, 2014), e corrigido as suas falhas. Um estudo pioneiro, que empregou conceitos do sistema CASA, aplicado a espermatozoides de peixes foi publicado em 1995 por Perchec e colaboradores (Perchec *et al.*, 1995) quando avaliaram as relações entre o conteúdo de ATP e a motilidade espermática em Carpa.

Apesar da excelente perspectiva para o uso do sistema CASA, seus custos de implantação sempre foram elevados (Fauvel, Suquet e Cosson, 2010; Kalbassi, Lorestani e Maramazi, 2013; Sanches *et al.*, 2013). Estes aspectos levaram ao desenvolvimento de sistema CASA em *software* livre, disponibilizado no ano de 2007 por Wilson-Leedy e Ingermann (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007). Apesar do sistema CASA ter sido projetado para realizar avaliações objetivas e repetíveis, o usuário deve ter cautela durante a realização das análises e na interpretação dos resultados, pois as configurações do *software* e as condições inadequadas para obtenção das imagens podem frequentemente levar a erros (Boryshpolets *et al.*, 2013).

Independentemente das técnicas utilizadas, a mensuração precisa da qualidade do esperma de peixes tem sido difícil, especialmente quando se pretende relacionar as características do movimento espermático e o verdadeiro potencial de fertilização destas células (Cabrita *et al.*, 2014). Apesar da disponibilidade de diferentes técnicas, com diferentes níveis de precisão, para mensurar a viabilidade dos espermatozoides, muitas vezes os resultados são contraditórios e, em alguns momentos inconsistentes. Possivelmente isso pode estar associado a falta de compreensão sobre o significado e as relações das variáveis obtidas por meio destas rotinas.

Portanto, a partir de técnicas cientométricas (Bar-Ilan, 2008), foi avaliada a contribuição e o impacto que o artigo que divulgou o sistema CASA em *software* livre para uso em peixes (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007) provocou na comunidade científica, levando-se em consideração as publicações na forma de artigos. Também foi avaliada a produção de artigos na área de análises andrológicas em peixes, entre os anos de 2007 e 2014 em revistas da área. Ainda

foram avaliados, nos diferentes sistemas CASA, as variáveis utilizadas pelos autores e as formas de interpretação dos resultados para determinar a viabilidade espermática e correlacionar os parâmetros de movimento espermático com o potencial de fertilização.

2. Materiais e Métodos

Para alcançar os objetivos realizou-se uma análise cientométrica, dividida em 3 etapas. Na primeira etapa, avaliou-se a contribuição do artigo “*Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters*” de autoria de Wilson-Leedy e Ingermann (2007), que é o primeiro artigo publicado utilizando análise espermática assistida computacional (CASA) em *software* livre em peixes, em seguida para a segunda etapa, avaliou-se as principais revistas que, publicam trabalhos relacionados com a reprodução de peixes, onde avaliamos artigos que realizaram análise do movimento espermático em peixes, pelo método subjetivo e através de algum dos sistemas CASA existentes, entre 2007 e 2014, por fim, na terceira etapa avaliou-se os métodos utilizados para interpretar e inferir sobre os resultados em artigos que utilizaram análise espermática através do CASA em *software* livre ou não, em peixes.

2.1 Primeira fase: Avaliação cientométrica da contribuição do artigo de Wilson-Leedy e Ingermann (2007).

Para a primeira fase do trabalho tomou-se como base a busca em um meio simples e popular, utilizando o banco de dados da plataforma do “*google acadêmico*” para avaliar o impacto que o artigo referência teve sobre a comunidade acadêmica desde sua publicação. A busca no “*google acadêmico*” foi necessária, porque a busca nos principais indexadores especializados como o “*ScienceDirect*”, “*Scopus*” e o “*Web of Science*”, não encontram-se todos os documentos, como os artigos não indexados nestas bases de dados, os livros, as dissertações e as teses que citaram o artigo referência.

Todas as informações técnicas, acadêmicas e científicas que citaram o artigo referência foram quantificadas e sistematizadas quanto ao gênero da informação, sejam eles artigos, livros, teses e dissertações. As informações também foram sistematizadas para descrever e avaliar a, frequência temporal das publicações, os grupos de animais estudados e, os principais periódicos utilizados.

Do total de artigos que citaram o artigo referência, quantificou-se os que utilizaram o sistema de análise espermática computadorizada CASA em *software* livre, em quais grupos de animais estes artigos foram classificados. Além disso foram quantificados os países de atuação do

autor correspondente de cada artigo, que utilizaram análise espermática com o CASA em *software* livre.

2.2 Segunda fase: Avaliação cientométrica temporal de artigos que realizaram análises andrológicas em peixes.

Para a segunda fase do trabalho, realizou-se buscas no banco de dados da “*ScienceDirect*”, com o objetivo de selecionar artigos publicados nos períodos de 2007 à 2014, que foram especificamente realizados com peixes e que utilizaram algum sistema de análise espermática computadorizada CASA em *software* livre ou não e/ou que tenham realizado análise de motilidade espermática pelo método subjetivo.

Realizaram-se buscas no banco de dados da “*ScienceDirect*”, com as palavras chave “*fish sperm*”, “*fish sperm CASA*”, “*fish semen*” e “*fish semen CASA*” em cinco diferentes revistas das áreas de aquicultura, reprodução animal, criopreservação de células e fisiologia, que publicam trabalhos realizados com peixes, “*Aquaculture*”, “*Theriogenology*”, “*Cryobiology*”, “*Animal Reproduction Science*” e “*Comparative Biochemistry and Physiology: Part A. Molecular & Integrative Physiology*”.

Com base nos artigos encontrados na busca da “*ScienceDirect*”, avaliou-se a distribuição quantitativa dos artigos nas revistas e a frequência com que os artigos foram publicados de 2007 até 2014.

2.3 Terceira fase: Características dos artigos que utilizam o CASA para as análises espermáticas em peixes.

Para a terceira fase do trabalho, foram utilizados todos os trabalhos da primeira fase e em igual proporção artigos aleatórios da segunda fase do trabalho. Todos estes artigos foram avaliados quanto às características: pesquisas com peixes, marinhos ou de água doce e análise espermática computadorizada com o sistema CASA. Buscou-se identificar como os autores usaram o CASA, quais as variáveis avaliadas, como eles interpretaram os resultados gerados e se essas interpretações foram aplicadas ou resultaram em resultados fragmentados.

A partir destas análises, foram mesurados os parâmetros: (A) percentual de artigos que avaliaram as variáveis do CASA isoladamente; (B) percentual de avaliação de dois ou mais tempos do movimento espermático; (C) percentual que utiliza quatro ou mais características, das geradas pelo CASA; (D) percentual de validação dos resultados do CASA com ensaio de fertilização e/ou eclosão dos ovos; (E) percentual que utilizou modelos estatísticos para agrupar as variáveis correlacionadas do CASA, e explicá-las sob os demais comportamentos espermáticos e/ou sobre a fertilização e/ou eclosão dos ovos; (F) percentual que utilizou modelos para mostrar e/ou explicar o movimento (cinética) dos espermatozoides; (G) percentual que usou modelos para explicar as variáveis do CASA sobre a fertilização e/ou eclosão dos ovos.

3. Resultados

Para a primeira fase do trabalho, encontrou-se 123 citações do artigo de Wilson-Leedy e Ingermann (2007), com informações técnicas e científicas de diversas naturezas. Os resultados apresentaram ocorrência de citação em 94 artigos (76,54%), 13 teses (10,6%), 10 dissertações (8,1%) e 6 livros publicados (4,9%) (Figura 1A) entre 2007 e 2014.

Considerando os 94 artigos publicados, a frequência de ocorrência destas publicações aumentou significativamente com o tempo (Efeito linear positivo; $p < 0,01$; $r = 0,93$), com um aumento de 85%, sendo, três em 2008, quatro em 2009, 15 em 2010, 17 em 2011, 17 em 2012, 18 em 2013 e 20 em 2014 (Figura 1B). Os livros, teses e dissertação não apresentaram ($p > 0,05$) comportamento linear crescente, nem mesmo decrescente (Figura 1B) com o passar do tempo.

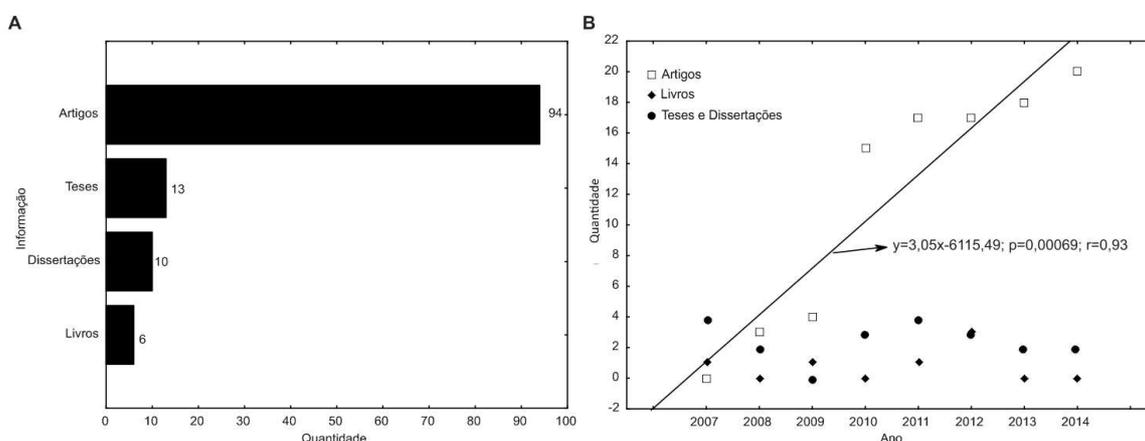


Figura 1. Trabalhos científicos que fizeram citação do artigo de Wilson-Leedy e Ingermann (2007). A) tipo de publicação; B) frequência das publicações.

Os artigos que citaram o trabalho de Wilson-Leedy e Ingermann, dividem-se em trabalhos realizados com peixes (70,2%); invertebrados marinhos (9,6%); mamíferos (8,5%); aves (4,3%); trabalhos específicos sobre procedimentos empregados no sistema CASA (4,5%) (Figura 2A), algas marinhas (2,1%), e por fim pesquisas com um protozoário flagelado (1,1%). Estes artigos fazem citação do trabalho referência e utilizam ou não análise com o sistema CASA, independentemente de ser sistema livre ou não.

Considerando somente os artigos científicos que citaram o trabalho de Wilson-Leedy e Ingermann, 55 artigos empregaram o CASA em *software* livre para avaliação de alguma variável espermática, sendo 35 pesquisas com peixes (63,6%), sete pesquisas com invertebrados marinhos (12,7%), cinco com mamíferos (9,1%), quatro com aves (7,3%) e um artigo com modificações do *software* do CASA livre (1,1%) (Figura 2A). Ainda destes artigos, um autor realizou pesquisas com um protozoário flagelado (1,8%) e dois autores utilizaram este sistema computacional para

estudos com toxicidade em algas marinhas das espécies *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis chui* (3,6%).

Os artigos que citaram o trabalho de Wilson-Leedy e Ingermann foram publicados em 33 periódicos diferentes, sendo os mais frequentes o “*Journal of Applied Ichthyology*”, o “*Theriogenology*” e o “*Aquaculture Research*” (Figura 2B).

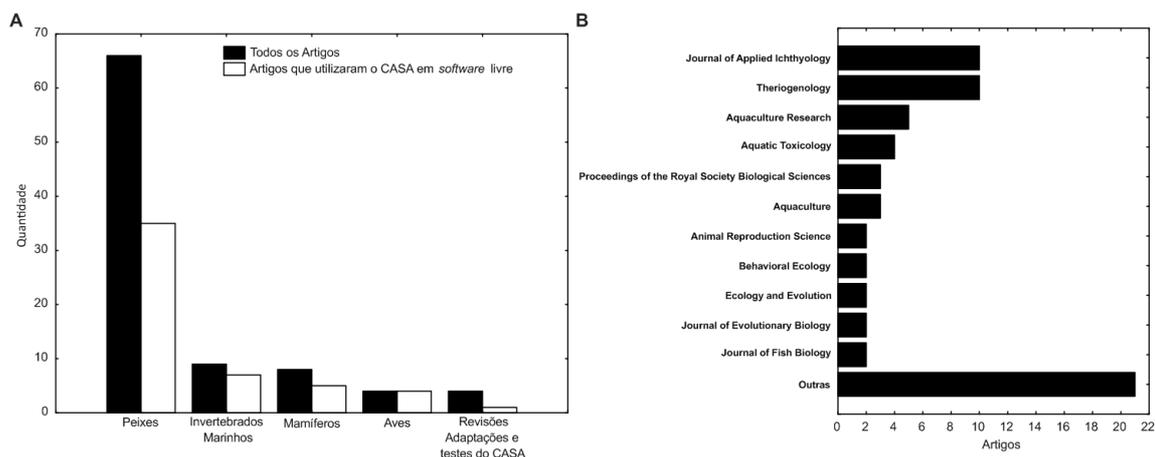


Figura 2. Trabalhos científicos que fizeram citação do artigo de Wilson-Leedy e Ingermann, 2007. A) classe de animal pesquisado; B) principais periódicos dos artigos.

Das publicações que utilizaram o CASA em *software* livre, os autores correspondentes, responsáveis pelo artigo atuam principalmente nos USA (30,9%), seguindo por França (10,9%), Reino Unido (10,9%), Brasil (7,3%), Canadá (7,3%), China (7,3%) e outros 9 países (25,5%) (Figura 3).

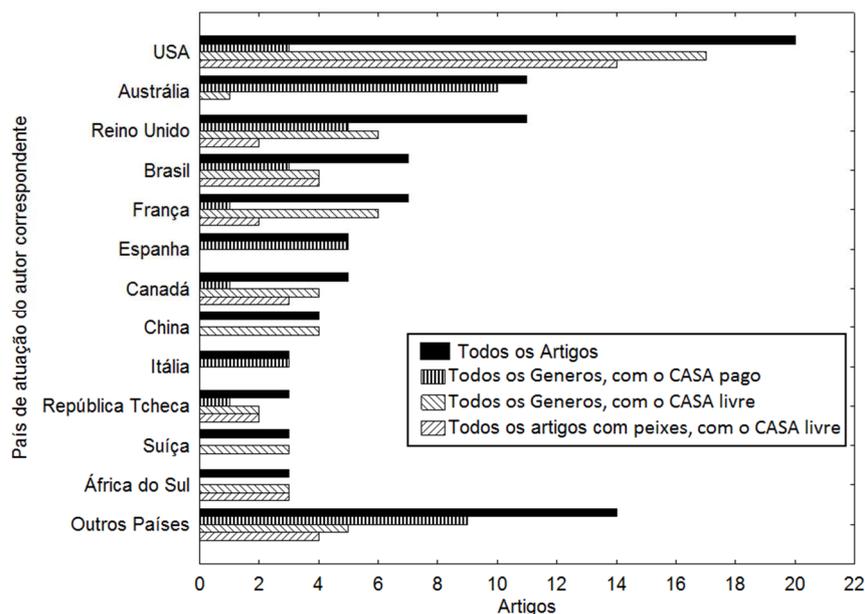


Figura 3. Trabalhos científicos que fizeram citação do artigo de Wilson-Leedy e Ingermann (2007). Países de atuação do autor correspondente dos artigos, para todos os gêneros de animais com o CASA em *software* pago e livre e, pesquisas somente com peixes com o CASA em *software* livre.

Para a segunda fase do trabalho, na busca realizada no banco de dados da “*ScienceDirect*” encontraram-se 206 artigos, dos quais 41,7% foram publicados no “*Aquaculture*”, 25,7% na “*Theriogenology*”, 16,0% na “*Cryobiology*”, 12,1% na “*Animal Reproductions Science*” e 4,4% na “*Comparative Biochemistry and Physiology: Part: A,*” (Figura 4A).

A frequência destas publicações aumentou significativamente com o tempo (linear positivo; $p < 0,05$; $r = 0,82$), com um aumento de 59,4% desde o ano de 2007 até 2014, do qual foram 13 publicações em 2007, 12 em 2008, 31 em 2009, 19 em 2010, 29 em 2011, 34 em 2012 e 36 em 2013 e 32 no ano de 2014 (Figura 4B).

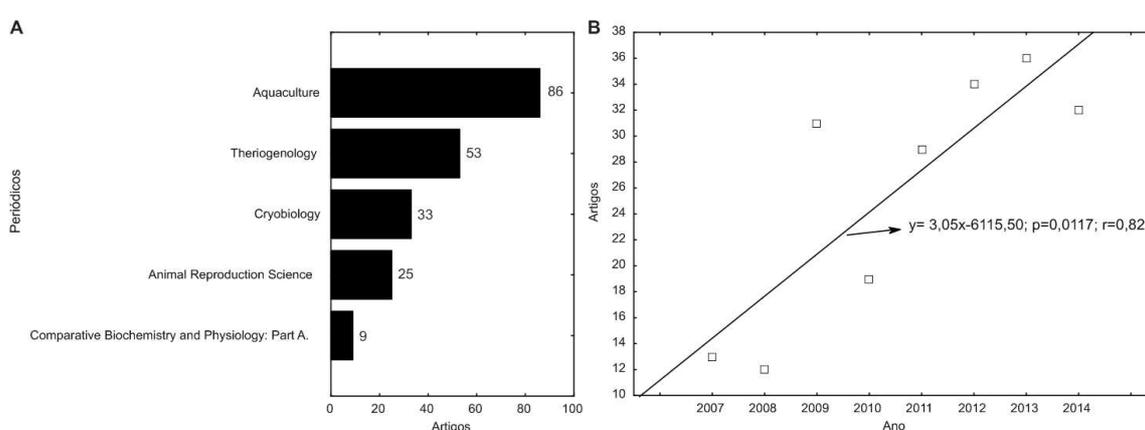


Figura 4. Artigos que realizaram análise de mobilidade espermáticas em peixes. A) distribuição dos artigos nos periódicos, de 2007 até 2014; B) frequência de publicação dos artigos.

Por fim, para a terceira fase do trabalho, do total de 66 artigos avaliados, 100% estudaram as variáveis espermáticas isoladamente, e 75,76% dos trabalhos avaliaram o movimento espermático em mais de um tempo da ativação espermática, ainda, aproximadamente metade dos trabalhos utiliza pelo menos quatro das características espermáticas geradas pelo sistema CASA (Tabela 1).

Contudo, aproximadamente 25% dos trabalhos exploram a validação das variáveis espermáticas com testes de fertilização e/ou eclosão ou exploraram modelos estatísticos para correlacionar e ou explicar as diferentes variáveis espermáticas (Tabela 1).

Menos de 10% dos artigos empregaram modelos para avaliar a cinética espermática (Tabela 1). Destes trabalhos, menos de 5% utilizaram modelos para explicar o efeito das variáveis espermáticas geradas pelo CASA sobre a fertilização e a eclosão dos ovos (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos artigos que utilizaram análise de mobilidade espermáticas através do sistema CASA, publicados de 2007 à 2014; dados extraídos dos materiais e métodos e resultados dos artigos.

Item	Característica avaliada	% de ocorrência
A	avaliou as variáveis do CASA isoladamente	100%
B	avalia em dois ou mais tempos do transcorrer do movimento espermático	75,76%
C	utiliza pelo menos quatro das características espermáticas geradas pelo CASA	51,52%
D	validou os resultados do CASA com ensaio de fertilização e/ou eclosão dos ovos	25,76%
E	usou modelos estatísticos para agrupar as variáveis correlacionadas do CASA e explicá-las sob os demais comportamentos espermáticos e/ou sobre a fertilização e/ou eclosão dos ovos	24,24%
F	utilizou de modelos para mostrar e/ou explicar a cinética dos espermatozoides	9,09%
G	usa modelos para explicar as variáveis do CASA sobre a fertilização e/ou eclosão dos ovos	4,55%

4. Discussão

O método mais antigo para a avaliação da fertilidade espermática em animais terrestres (Amann e Waberski, 2014) e mais recentemente para animais aquáticos era o método subjetivo de avaliação do movimento espermático (Rurangwa *et al.*, 2004). Esta técnica foi muito difundida devido a sua rapidez e praticidade (Viveiros *et al.*, 2012) e relativa confiabilidade, onde um observador treinado pode avaliar o movimento espermático diretamente em um microscópio de luz (Viveiros *et al.*, 2012)

Para a análise espermática em peixes, este método pode ser prático e fácil, contudo apresenta possibilidades de imprecisão, especialmente devido ao erro humano e a dificuldade de realizar a análise em algum momento específico após o início do movimento dos espermatozoides (Kime *et al.*, 2001). Além disso, o método subjetivo impossibilita a avaliação da cinética do movimento espermático.

Apesar dos aspectos positivos quanto ao emprego da análise subjetiva em peixes, nos últimos anos o meio científico tem exigido o emprego de análises objetivas para qualificar ou quantificar a viabilidade espermática. Dentre os métodos objetivos, a análise do sêmen assistida por computador ou sistema CASA tem sido muito recomendado e, os *softwares* livre tem recebido atenção.

O trabalho pioneiro quanto a divulgação de um sistema CASA em *software* livre, intitulado “*Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters*” publicado em 2007 na revista *Theriogenology* obteve grande aceitação e contribuiu muito para o meio científico e acadêmico, especialmente por promover a inserção e estimular o uso desta ferramenta em rotinas com peixes.

O *plugin* CASA utilizado por meio do *software* livre Image J impactou não somente os setores que trabalham com sêmen de peixes, mas também com sêmen de outros animais (Lemaître *et al.*, 2012; Fitzpatrick *et al.*, 2010; Fisher *et al.*, 2014) e até mesmo para avaliação do movimento de outros organismos como algas unicelulares (Liu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011a) ou para a avaliação de axonemas (Zukas *et al.*, 2012).

Os resultados demonstram que o principal mecanismo de divulgação do uso do sistema CASA de análises espermáticas em *software* livre é através de artigos científicos em periódicos especializados, especialmente da área de ictiologia (Dziewulska, Rzemieniecki e Domagala, 2011), reprodução animal (Sanches *et al.*, 2013b) e aquicultura (Mylonas *et al.*, 2013).

Os resultados demonstram que, durante os últimos oito anos ocorreu um crescimento do número de artigos científicos que utilizaram métodos de avaliação das características espermáticas pelo sistema CASA em *software* livre na análise da mobilidade espermática em peixes. Este aumento pode estar relacionado com o crescimento da aquicultura (FAO, 2014), que exige maiores padrões de qualidade, e conseqüentemente mais pesquisas com espécies de interesse comercial, melhorando a gestão de reprodutores e aperfeiçoando as técnicas de manipulação espermática (Cabrita *et al.*, 2014).

O aspecto comum dos artigos publicados que utilizam análise de mobilidade espermática em peixes pelo sistema CASA, é de utilizar e avaliar isoladamente os parâmetros gerados pelo *software*. Além disso, grande parte dos artigos avalia as características dos espermatozoides ao longo do tempo após o início do movimento espermático.

A avaliação do movimento espermático ao longo do tempo apresenta variações entre os autores devido às dificuldades de manipular o sêmen junto ao microscópio em encontrar o foco da imagem em curtos períodos de tempo. Isso leva os pesquisadores a realizarem as avaliações em momentos pontuais, em intervalos fixos, acumulados ou aleatórios, que variam de 5 (Kalbassi, Lorestani e Maramazi, 2013) à 30 (Alavi *et al.*, 2011) ou até à 120 (Kanuga *et al.*, 2011) segundos após o início da ativação.

Outra característica importante, é que boa parte dos trabalhos avaliam seus resultados principalmente através do percentual de espermatozoides móveis, das características de velocidade espermática e dos padrões de natação dos espermatozoides. Poucos são os trabalhos que utilizaram o CASA para validar o efeito das variáveis espermáticas mensuradas pelo CASA sobre o real produto da reprodução, que é a produção de ovos, embriões e larvas viáveis (Bobe e Labbé, 2010). Um dos poucos trabalhos que realizaram este procedimento, foi o trabalho de Kalbassi, Lorestani e Maramazi, (2013), onde os autores avaliaram o efeito de soluções ativadoras em vários parâmetros espermáticas gerados pelo sistema CASA e validaram seus efeitos sobre a fertilização, incubação e taxa de deformações das larvas.

De mesmo modo, os resultados também sugerem que uma baixa proporção dos trabalhos correlacionam as variáveis do CASA entre si, e com outras variáveis de viabilidade espermática com a fertilização ou eclosão dos ovos (Dziewulska e Domagala, 2013). Alguns autores agrupam as variáveis altamente correlacionadas ou explicam apenas uma destas variáveis quando, verificam uma alta correlação entre elas, após utilizam de análises estatísticas de efeitos principais. Esta alta correlação é normalmente encontrada quando testadas as velocidades curvilínea, média de deslocamento e velocidade em linha reta (Lehnert *et al.*, 2012).

Além disso, poucos trabalhos realizam a avaliação da cinética do movimento espermático. Alguns autores utilizaram modelos não lineares para avaliar o comportamento do movimento espermático (Sanches *et al.*, 2013a), mas não interpretam o significado destes resultados. Neste caso, a definição dos parâmetros da cinética espermática pode apresentar importância significativa para o processo reprodutivo (Rodina *et al.*, 2008), pois define a condição de ativação espermática em diferentes soluções ativadoras ou durante a criopreservação do sêmen, não de forma pontual, mas ao longo de todo o processo de ativação espermática.

Por fim, poucos trabalhos utilizam modelos estatísticos para explicar as características espermáticas geradas pelo CASA sobre a fertilização e/ou a eclosão dos ovos. Um dos poucos trabalhos que o realiza é o artigo de Viveiros *et al.*, (2010), que realizou as avaliações espermáticas do sêmen criopreservado com o sistema CASA e correlacionou as variáveis de velocidade espermática com as taxas de fertilização dos ovos de *Phochilodus lineatus*. Estes autores encontraram uma correlação significativa ($p < 0,05$) de $r=0,8$; $r=0,72$ e $r=0,56$ para as velocidades curvilínea, velocidade média de deslocamento e velocidade em linha reta, respectivamente, no ensaio de fertilização dos ovos com espermatozoides criopreservados em diferentes meios de congelamento.

O CASA apresenta uma série de resultados das características espermáticas, onde muitas vezes é difícil relacioná-las com a função específica do esperma (Bobe e Labbé, 2010; Amann e Waberski, 2014). Grande parte dos pesquisadores tem dificuldades de interpretar pontualmente cada uma destas características com a fertilidade dos espermatozoides de peixes. Provavelmente isso está associado à escassez de informações sobre a relação das variáveis geradas pelo sistema CASA e a fertilização dos ovos ou a eclosão.

Vários parâmetros gerados pelo sistema CASA são correlacionados entre si e gerados a partir de uma ou mais variáveis isoladas do próprio sistema CASA (Davis *et al.*, 1992). Desta forma, os estudos voltados à interpretação destas variáveis podem sugerir a exclusão das rotinas de avaliação, de algumas variáveis pouco significativas.

E em algum momento todas as medidas de qualidade espermática geradas pelo CASA devem ser validadas (Rurangwa *et al.*, 2004; Amann e Waberski, 2014) e, identificadas as medidas que realmente tem influência sobre o sucesso da fertilização dos ovos.

O sistema CASA de análise espermática é importante e mundialmente utilizado e aceito nas avaliações de espermatozoides de peixes. Neste cenário, o emprego de *softwares* livre tem ganhado espaço e confiabilidade no meio científico. Porém, é pouco provável que as análises subjetiva do movimento espermático venham a deixar de serem realizadas, pois apresentam vantagens para aplicação em rotinas de campo ou em rotinas que não exijam elevados índices de precisão. Esta afirmação pode ser corroborada pelo fato de que pesquisas recentes estão sendo publicadas em periódicos conceituados, praticando a análise do movimento espermático pelo método subjetivo.

Finalmente, a tendência mundial pela diminuição do uso de animais em pesquisas, sugere que em breve será necessário começar a explorar o uso de modelagem e simulação computacional nas avaliações da qualidade espermática, de modo que seja possível prever com segurança o comportamento espermático sem necessariamente realizar os ensaios de fertilização *in vitro*.

5. Conclusão

Apesar da eficácia do CASA para avaliação dos parâmetros espermáticos e a grande aceitação deste método pela comunidade científica, novas pesquisas devem ser desenvolvidas para buscar a melhor compreensão das variáveis geradas por este sistema para garantir a correta interpretação dos resultados e da qualidade espermática. Aparentemente, os pesquisadores não estão sabendo utilizar o CASA em sua totalidade, o fazem por ser exigência das revistas e por ser considerada uma análise robusta.

6. Referências

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

Alavi, S. M. H.; Gela, D.; Rodina, M.; Linhart, O. (2011). Roles of osmolality, calcium – Potassium antagonist and calcium in activation and flagellar beating pattern of sturgeon sperm. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 160: 166-174.

Amann, R. P.; Katz, D. F. (2004). Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*. 25 (3): 317-325.

Amann, R. P.; Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*. 81: 5-17.

Aramli, M. S.; Kalbassi, M. R.; Nazari, R. M.; Aramli, S. (2013). Effects of short-term storage on the motility, oxidative stress, and ATP content of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) sperm. *Animal Reproduction Science*. 143: 112-117.

Bar-Ilan, J. (2008). Informetrics at the beginning of the 21st century-A review. *Journal of Informetrics*. 2: 1-52.

Bobé, J.; Labbé, C. (2010). Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*. 165: 535-548.

Boryshpolets, S.; Kowalski, R. K.; Dietrich, G. J.; Dzyuba, B.; Ciereszko, A. (2013). Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology*. 80: 758-765.

Cabrita, E.; Martínez-Párama, S.; Gavaia, P. J.; Riesco, M. F.; Valcarce, D. G.; Sarasquete, C.; Herráez, M. P.; Robles, V. (2014). Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, 432: 389-401.

Carvalho, A. F. S.; Machado, M. R. F.; Andrade, E. S.; Murgas, L. D. S.; Zangeronimo, M. G. (2014). Effect of caffeine added to the activating solution on sperm motility of fresh and thawed semen of Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, and Curimba, *Prochilodus lineatus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 45(1): 75-81.

Clotfelter, E. D.; Gendelman, H. K. (2014). Exposure to environmentally relevant concentrations of genistein during activation does not affect sperm motility in the Fighting Fish *Betta splendens*. *BioMed Research International*. 1-5.

Davis, R. O.; Katz, D. F. (1992). Standardization and Comparability of CASA Instruments. *Journal of Andrology*. 13(1): 81-86.

Dziewulska, K.; Domagala, J. (2013). Spermatozoa concentration influences cryopreservation success in sea trout (*Salmo trutta m. trutta* L.). *Theriogenology*. 80: 659-664.

Dziewulska, K.; Rzemieniecki, A.; Domagala, J. (2011). Sperm motility characteristics of wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and sea trout (*Salmo trutta m. trutta* L.) as a basis for milt selection. *Journal of Applied Ichthyology*. 27: 1047-1051.

FAO. (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nations. E-ISBN 978-92-5-108276-8. 243p.

Fauvel, C.; Suquet, M.; Cosson, J. (2010). Evaluation of fish sperm quality. *Journal of Applied Ichthyology*. 26: 636-643.

Fisher, H. S.; Giomi, L.; Hoekstra, H. E.; Mahadevan, L. (2014). The dynamics of sperm cooperation in a competitive environment. *Proceedings B*. 281: n° 1790. 1-21.

- Fitzpatrick, J. L.; Garcia-Gonzalez, F.; Evans, J. P. (2010). Linking sperm length and velocity: the importance of intramale variation. *Biology Letters*. 6: 797-799.
- Kalbassi, M. R.; Lorestani, R.; Maramazi, J. (2013). Analysis of saline activador solution effects on sperm quality indices of *Barbus sharpeyi* by Image J software. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 12(2): 357-377.
- Kanuga, M. K.; Benner, M. J.; Doble, J. A.; Wilson-Leedy, J. G.; Robison, B. D.; Ingermann, R. L. (2011). Effect of aging on male reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Zoology. Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 315: 156-161.
- Kime, D. E.; Van Look, K. J. W.; McAllister, B. G.; Huyskens, G.; Rurangwa, E.; Ollevier, F. (2001). Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part C*. 130: 425-433.
- Lehnert, S. J.; Heath, D. D.; Pitcher, T. E. (2012). Sperm trait differences between wild and farmed Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). 344-349: 242-249.
- Lemaître, J. F.; Ramm, S. A.; Hurst, J. L.; Stockley, P. (2012). Sperm competition roles and ejaculate investment in a promiscuous mammal. *Journal of Evolutionary Biology*. 25: 1216-1225.
- Liu, G.; Wu, H.; Chai, X.; Shao, Y.; Hu, L.; Liu, B.; Fang, J. (2011). Toxicity effect of two disinfectants on motility of two marine microalgae, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis chui*. *Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE)*. 1-3.
- Liu, G.; Chai, X.; Shao, Y.; Hu, L.; Xie, Q.; Wu, H. (2011). Toxicity of copper, lead, and cadmium on the motility of two marine microalgae *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis chui*. *Journal of Environmental Sciences*. 23(2): 330-335.
- Liu, Y.; Xu, T.; Robinson, N.; Qin, J.; Li, X. (2014). Cryopreservation of sperm in farmed Australian greenlip abalone *Haliotis laevis*. *Cryobiology*. 68: 185-193.
- Martínez-Páramo, S.; Diogo, P.; Dinis, M. T.; Herráez, M. P.; Sarasquete, C.; Cabrita, E. (2012). Sea bass sperm freezability is influenced by motility variables and membrane lipid composition but not by membrane integrity and lipid peroxidation. *Animal Reproduction Science*. 131: 211-218.
- Mylonas, C. C.; Mitrizakis, N.; Papadaki, M.; Sigelaki, I. (2013). Reproduction of hatchery-produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity I. Description of the annual reproductive cycle. *Aquaculture*. 414-415: 309-317.
- Nynca, J.; Kuźmiński, H.; Dietrich, G. J.; Hliwa, P.; Dobosz, S.; Liszewska, E.; Karol, H.; Ciereszko, A. (2012). Biochemical and physiological characteristics of semen of sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Theriogenology*. 77: 174-183.
- Perchee, G.; Jeulin, C.; Cosson, J.; André, F.; Billard, R. (1995). Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science*. 108: 747-753.

- Rodina, B.; Policar, T.; Linhart, O.; Rougeot, C. (2008). Sperm motility and fertilizing ability of frozen spermatozoa of males (XY) and neomales (XX) of perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Applied Ichthyology*. 24: 438-442.
- Rurangwa, E.; Kime, D. E.; Ollevier, F.; Nash, J. O. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*. 234: 1-28.
- Sanches, E. A.; Marcos, R. M.; Okawara, R. Y.; Caneppele, D.; Bombardelli, R. A.; Romagosa, E. (2013a). Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. *Journal of Applied Ichthyology*. 1-9.
- Sanches, E. A.; Neumann, G.; Toledo, C. P. R. de.; Bombardelli, R. A.; Piana, P. A.; Romagosa, E. (2013b). Temperature and storage period over spermatoc parameters of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Aquaculture Research*. 44: 534-541.
- Simpson, J. L.; Humphries, S.; Evans, J. P.; Simmons, L. W.; Fitzpatrick, J. L. (2014). Relationships between sperm length and speed differ among three internally and three externally fertilizing species. *The Society for the Study of Evolution*. 68(1): 92-104.
- Tian, Y.; Qi, W.; Jiang, J.; Wang, N.; Wang, D.; Zhai, J.; Chen, C.; Chen, S. (2013). Sperm cryopreservation of sex-reversed seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Animal Reproduction Science*. 137: 230-236.
- Viveiros, A. T. M.; Nascimento, A. F.; Orfão, L. H.; Isaú, Z. A. (2010). Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*. 74: 551-556.
- Viveiros, A. T. M.; Orfão, L. H.; Nascimento, A. F.; Corrêa, F. M.; Caneppele, D. (2012). Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). *Theriogenology*. 78: 361-368.
- Whitehead, J. A.; Benfey, T. J.; Martin-Robichaud, D. J. (2012). Ovarian development and sex ratio of gynogenetic Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*. 324-325: 174-181.
- Wilson-Leedy, J. G.; Ingermann, R. L. (2007). Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*. 67: 661-672.
- Zukas, R.; Chang, A. J.; Rice, M.; Springer, L. (2012). Structural analysis of flagellar axonemes from inner arm dynein knockdown strains of *Trypanosoma brucei*. *Biocell*. 36(3): 133-142.
- Zupa, R.; Fauvel, C.; Mylonas, C. C.; Santamaria, N.; Valentini, L.; Pousis, C.; Papadaki, M.; Suquet, M.; Gándara, F. de la.; De Metrio, G.; Corriero, A. (2013). Comparative analysis of male germ cell proliferation and apoptosis in wild and captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.). *Journal of Applied Ichthyology*. 29: 71-81.

Artigo II: Efeitos da velocidade espermática e da relação
espermatozoides móveis:ovócito sobre o sucesso reprodutivo do jundiá
cinza (*Rhamdia quelen*)

Preparado de acordo com as normas da revista *Aquaculture*.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos interativos ou independentes da relação espermatozoides móveis:ovócito e da velocidade espermática em procedimentos de reprodução artificial com o uso do sêmen do jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) criopreservado. Através do *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) foram avaliadas em seis réplicas a motilidade e a velocidade espermática do sêmen criopreservado a partir de oito segundos da sua ativação e a cada um segundo até o termino do movimento espermático. Para o ensaio de fertilização foi aplicado um delineamento experimental em esquema fatorial (6 x 3) composto de seis relações espermatozoides móveis:ovócito (70.000, 90.000, 110.000, 130.000, 150.000 e 170.000), três velocidades espermáticas (60, 40 e 20 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) e três réplicas ou blocos experimentais (“pools” de ovócitos provenientes de três grupos de fêmeas). As curvas de ativação dos espermatozoides (cinéticas) foram elaboradas com auxílio de modelo estatístico não linear. Os efeitos foram avaliados sobre as taxas de fertilização, eclosão e larvas normais. Na avaliação das variáveis, a análise de superfície de resposta não mostrou efeito interativo ($p>0,05$) entre a relação espermatozoides móveis:ovócito e as velocidades espermáticas, sobre as taxas de fertilização, de eclosão e de larvas normais. Somente foi encontrado efeito linear ($p<0,05$) da velocidade espermática sob as taxas de fertilização e de eclosão dos ovos. De acordo com os resultados, conclui-se que não há diferença alguma entre uso de 70.000 até 170.000 espermatozoides móveis para cada ovócito sobre o sucesso reprodutivo em termos de taxa de fertilização, eclosão dos ovos e normalidade larval do jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) e, que o valor da velocidade espermática é determinante sobre o sucesso reprodutivo dos espermatozoides de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) diminuindo as taxas de fertilização e eclosão conforme diminui a velocidade espermática.

Keywords: dose inseminante, espermatozoide, sêmen de peixe

7. Introdução

As técnicas de congelamento podem induzir a injúrias aos espermatozoides, devido à formação de cristais de gelo intracelular (Barbas e Mascarenhas 2009). Durante o processo de criopreservação os espermatozoides sofrem diversas modificações de fluidez e das propriedades funcionais das membranas (Castelo *et al.*, 2010) devido as alterações osmóticas (Martínez-Páramo *et al.*, 2012), a adição de crioprotetores álcoois (Arruda, 2000), ao congelamento e ao descongelamento das células espermáticas (Wang *et al.*, 2010). O procedimento de criopreservação das células espermáticas pode reduzir a qualidade dos espermatozoides (Rurangwa *et al.*, 2004), principalmente no que se refere às taxas de motilidade, à velocidade e ao índice de linearidade, além da integridade da membrana espermática (Martínez-Páramo *et al.*, 2012).

A taxa de motilidade (Bobe e Labbé, 2010; Martínez-Páramo *et al.*, 2012) e a velocidade dos espermatozoides (Viveiros *et al.*, 2010) são amplamente utilizadas para avaliar os efeitos do processamento do sêmen sobre a viabilidade e a fertilidade das células espermáticas. Nestas rotinas de avaliação, o emprego de técnicas de análise espermática computadorizada (CASA) (Amann e Waberski, 2014) permite a obtenção de diversas variáveis espermáticas, as quais permitem a interpretação do comportamento do movimento espermático e dos efeitos das variáveis que interferem sobre este processo (Bobe e Labbé, 2010).

A viabilidade e a fertilidade dos espermatozoide têm sido estimadas por meio de diversas variáveis. Dentre as variáveis, a velocidade espermática está diretamente relacionada à fertilização dos ovócitos, uma vez que os espermatozoides velozes apresentam maiores chances de alcançar os ovócitos e concluir o processo de fertilização (Gasparini *et al.*, 2010; Liljedär *et al.*, 2008; Gage *et al.*, 2004).

Além da velocidade (Gage *et al.*, 2004; Liljedär *et al.*, 2008; Viveiros *et al.*, 2010), o número de espermatozoides (Stoltz e Neff, 2006; Boschetto *et al.*, 2011) e a longevidade do movimento espermático (Cosson *et al.*, 2008) podem interferir de forma independente ou conjunta com a velocidade espermática sobre o encontro dos gametas (Browne *et al.*, 2015). Pesquisas relacionadas a este tema, sugerem a ocorrência de competição entre espermatozoides de diferentes machos de fecundação externa, os autores Burness *et al.* (2004), Gage *et al.* (2004) e Liljedär *et al.* (2008) apontam o sucesso na competição espermática à velocidade espermática diferenciada, por favorecer a fertilização pelos espermatozoides mais rápidos no, salmão do ártico (*Salvelinus alpinus*) (Liljedär *et al.*, 2008), no salmão selvagem do Atlântico (*Salmo salar*) (Gage *et al.*, 2004) e no bluegill (*Lepomis macrochirus*) (Burness *et al.*, 2004). De modo contrário,

Stoltz e Neff, (2006) sugerem que o sucesso na competição espermática entre machos está relacionada ao número de espermatozoides, em bluegill (*Lepomis machochirus*).

Por outro lado, em um peixe de fertilização interna (*Poecilia reticulata*) o principal preditor do sucesso na competição espermática é dado ao número de espermatozoides, seguido por uma menor influência da velocidade espermática (Boschetto *et al.*, 2011). Já em outro estudo (Smith, 2012) com outro peixe de fecundação interna (*Xiphophorus nigrensis*), a velocidade espermática não foi a principal responsável pela paternidade, cabendo a motilidade espermática ser o determinante do sucesso da competição espermática, em trabalho onde o número de espermatozoides foi controlado.

Em geral, o *Rhamdia quelen* apresenta a demanda de 90.000 espermatozoides por ovócito para garantir boas taxas de sucesso na fertilização artificial com o sêmen fresco (Bombardelli *et al.*, 2006) e as mesmas relações tem sido empregadas com o sêmen criopreservado em escala experimental. Contudo, um limitante para a viabilização do emprego do sêmen criopreservado para uso em larga escala é a inexistência de técnicas que disponibilizem, em único contêiner criogênico, o número mínimo necessário de espermatozoides para garantir o sucesso da fertilização artificial dos ovócitos de uma ou mais fêmeas (Cabrita *et al.*, 2001; Butts *et al.*, 2011).

A possibilidade de existência de relação entre a velocidade espermática e o número de espermatozoides móveis empregados nos procedimentos de fertilização artificial, abre novas possibilidades para viabilizar estas rotinas, uma vez que a modulação do movimento espermático pode permitir a economia de espermatozoides (Robles *et al.*, 2003; Valdebenito *et al.*, 2007; Neumann, 2012) e viabilizar o congelamento de menores volumes de sêmen em um único contêiner criogênico (Adames, 2014).

Portanto, o objetivo desta pesquisa foi utilizar modelos de predição da velocidade espermática em sêmen criopreservado e, avaliar a relação entre a velocidade dos espermatozoides e a demanda de espermatozoides móveis em rotinas de reprodução artificial do *Rhamdia quelen*, uma espécie neotropical com importância para a aquicultura na América do Sul (Koakoski *et al.*, 2012).

8. Materiais e Métodos

8.1. Animais experimentais e manipulação hormonal

Foram selecionadas 18 fêmeas que apresentaram abdômen abaulado, papila urogenital avermelhada e que liberaram ovócitos sob leve pressão abdominal, quando realizada no sentido

céfalo-caudal e seis machos que liberaram sêmen por meio de leve pressão abdominal (Tessaro *et al.*, 2012).

Realizou-se a indução hormonal dos machos e das fêmeas, que foi realizada nas fêmeas por meio de aplicação via intra-muscular de 5,5mg de extrato pituitário de carpa (EPC).kg de reprodutor⁻¹ em duas dozes de 10 e 90% da concentração total com intervalo de 12horas, para os machos foi aplicada doze única (100%) de 3,0mg de EPC.Kg⁻¹ (Sanches *et al.*, 2011).

Após 240 unidades térmicas acumuladas (10 horas; água a 24°C) contadas a partir da última aplicação hormonal, o sêmen e os ovócitos foram coletados por meio de massagem abdominal no sentido céfalo-caudal (Sanches *et al.*, 2011). Nos machos as primeiras parcelas do material liberado foram desprezadas para evitar a possível contaminação com urina, muco, fezes e/ou água (Khara *et al.*, 2012).

8.2. Criopreservação do sêmen e avaliação da dinâmica do movimento espermático

Os seis machos (246±151g) submetidos a manipulação hormonal e a coleta do sêmen forneceram material para compor uma amostra composta ou um “*pool*” de sêmen, do qual amostras foram imediatamente submetidas as análises seminais e espermáticas.

O volume de sêmen liberado (6,23±3,18mL) por cada um dos peixes foi mensurado em tubos de ensaio graduados, com precisão de ±0,1mL (Sanches *et al.*, 2013). Durante a manipulação e avaliação das características seminais e espermáticas, o sêmen foi conservado sob refrigeração (12±1°C) (Kanuga *et al.*, 2012).

Em seguida foi verificada a ocorrência de ativação dos espermatozoides (presença ou ausência de espermatozoides móveis no sêmen fresco) por visualização subjetiva (Viveiros *et al.*, 2012). Para compor o “*pool*” de sêmen, foram selecionadas as parcelas de sêmen provenientes dos reprodutores que não apresentavam espermatozoides móveis.

Do “*pool*” de sêmen foram retiradas amostras para avaliação das variáveis espermáticas pelo *plugin* CASA em *software* livre, adaptado para a espécie (Neumann *et al.*, 2013). As avaliações foram realizadas a partir dos oito segundos após o início da ativação espermática e, a cada segundo, até o termino da ativação espermática. Para tanto, uma alíquota do sêmen fresco foi diluída com solução ativadora (água destilada) na proporção de 1:1000µl (sêmen:solução ativadora) em seis réplicas. Os vídeos foram capturados em objetiva de 10X (Neumann *et al.*, 2013). As variáveis avaliadas foram a motilidade espermática (83,99±37,67% em 8 seg), a velocidade curvilínea (VCL), a velocidade média de deslocamento (VMD) (62,51±28,00µm.s⁻¹ em 8 seg) e a velocidade em linha reta (VLR).

As variáveis VCL, VMD e VLR foram analisadas através da análise de componentes principais (PCA) para verificar se as mesmas são correlacionadas entre si. Devido a elevada correlação ($r=0,63$; $r=0,96$ e $r=0,91$), entre as diferentes velocidades espermáticas, adotou-se a velocidade média de deslocamento (VMD) como a principal velocidade espermática e variável foco neste estudo (Lehnert *et al.*, 2012; Smith, 2012), denominada a seguir como velocidade espermática (VE) (adaptado de Tessaro *et al.*, 2012).

Para avaliar a dinâmica do movimento espermático e determinar a velocidade dos espermatozoides ao longo do tempo, foi aplicado um modelo matemático não linear sobre as variáveis de motilidade (Mot) e velocidade espermática (VE) oito segundos após a ativação espermática e a cada um segundo ao longo do tempo de ativação do sêmen fresco e criopreservado, gerando uma representação senoidal representada por:

$$\text{Variável} = \frac{1}{(1-h_0)e^{-r(t)}} \quad (\text{Adaptado de Sanches } et al., 2013)$$

Sendo:

Variável – Mot e/ou VE calculada para um instante (t) qualquer;
 h_0 - parâmetro relacionado a variável inicial (tempo 0 seg);
 r - parâmetro relacionado à taxa de decréscimo da variável.

Alíquotas do sêmen fresco foram avaliadas quanto a concentração espermática ($3,40 \times 10^{10} \pm 0,59 \times 10^{10}$ espermatozoides.mL⁻¹) em microscópio de luz em objetiva de 40X pelo método de contagem de células espermáticas em câmara hematimétrica de Neubauer, onde as amostras de sêmen fresco foram fixadas em solução de formol salina tamponada a uma diluição de 1:1000 (Sanches *et al.*, 2013). A avaliação morfológica das células espermáticas ($77,44 \pm 1,50\%$ de espermatozoides normais) foi realizado em microscópio de luz em objetiva de 40X, avaliando 300 células (Tessaro *et al.*, 2012).

Para a criopreservação do sêmen fresco, o “pool” de sêmen foi diluído na proporção de 1:3 (sêmen:diluidor) em solução contendo 5,0% de D-frutose, 5,0% de leite em pó e 10% de metanol (3.016mOsm) (Adames, 2014). Após a diluição, o material foi envasados em 200 palhetas de 0,25mL e submetidos ao congelamento em botijão de vapor de nitrogênio por 18 horas. Em seguida as palhetas foram transferidas e estocadas diretamente em nitrogênio líquido (Adames, 2014)

O descongelamento ocorreu 24 horas após a estocagem em nitrogênio líquido, pela imersão das palhetas em água a temperatura ambiente (25°C) por 10 segundos (Adames, 2014). Após o descongelamento, a ativação espermática foi realizada com solução ativadora (água destilada) por meio da diluição do sêmen na proporção de 1:250µL (sêmen:solução ativadora). Do

“pool” de sêmen foram avaliadas seis réplicas, constituídas cada uma por uma palheta. As variáveis espermáticas do sêmen criopreservado foram analisadas conforme descrito anteriormente para o sêmen fresco.

8.3. Ensaio de fertilização: velocidade espermática X número de espermatozoides

Os ensaios de fertilização foram realizados em um delineamento experimental em esquema bi-fatorial 6x3x3, com 18 tratamentos e três repetições. Os fatores experimentais foram constituídos pelo emprego do sêmen criopreservado na fertilização artificial de ovócitos apresentando as relações de 70.000, 90.000, 110.000, 130.000, 150.000 e 170.000 espermatozoides móveis.ovócito⁻¹ e, as velocidades espermáticas correspondentes a 20, 40 e 60µm.s⁻¹. Cada repetição foi constituída por um “pool” de ovócito composto pelos gametas de seis fêmeas. As unidades experimentais foram compostas por incubadoras de 2,5L contendo aproximadamente 2506 ovos.

Além dos tratamentos anteriormente descritos, foi utilizado outro tratamento como controle. O controle foi constituído pela fertilização dos ovócitos com sêmen criopreservado, na proporção de 90.000 espermatozoides móveis.ovócito⁻¹. A ativação dos gametas ocorreu imediatamente após a adição da solução ativadora e, portanto, a velocidade no tempo “0” não pode ser quantificada.

O número de espermatozoides móveis foi corrigido conforme Adames (2014). Para promover as diferentes velocidades espermáticas (20, 40 e 60µm.s⁻¹), utilizou-se das informações fornecidas pelo modelo não linear utilizado para gerar as curvas de ativação espermática. Com base nestas informações, após o descongelamento do sêmen, os espermatozoides foram ativados com 20mL de água destilada e, após o tempo determinado que garantiu as respectivas velocidades (30,3; 15,9 e 10,9 segundos após a ativação dos espermatozoides), estes foram misturados aos ovócitos. Após a mistura, os gametas foram homogeneizados pelo período de 60 segundos e finalmente transferidos para as incubadoras.

O efeito dos tratamentos foi observado com base na estimativa das taxas de fertilização e de eclosão dos ovos e no percentual de larvas normais. A mensuração das taxas de fertilização artificial foi realizada após o fechamento do blastóporo do embrião, aproximadamente 12 após a fertilização (Pereira *et al.*, 2006), por meio da contagem de três sub amostras de cada unidade experimental com aproximadamente 135 ovos.

Após o término da eclosão dos ovos (± 934 UTA ou 38,0 horas; água a $24,57 \pm 0,60^\circ\text{C}$), todas as larvas foram fixadas em solução de formalina a 4%, tamponada com carbonato de cálcio. A partir das larvas fixadas foi determinada a taxa de normalidade larval, por meio da contagem e

classificação em microscópio estereoscópico (10X) de 300 indivíduos de cada unidade experimental. Foram consideradas como larvas normais aquelas que não apresentavam nenhum tipo de alteração na coluna vertebral, saco vitelínico ou cabeça (Jeziarska, Lugowska e Witeska, 2009). Pela contagem de todas as larvas fixadas foi determinada também a taxa de eclosão em cada unidade experimental.

8.4. *Análises estatísticas*

Os dados relativos às taxas de fertilização, eclosão dos ovos e normalidade larval foram submetidos a transformação pela raiz quadrada do arco seno para homogeneizar a variância. As possíveis influências da dose inseminante e da velocidade espermática sobre as variáveis respostas foram avaliadas através do protocolo de regressão linear do modelo de superfície de resposta. Em caso de efeito significativo do modelo de superfície de resposta, realizou-se a plotagem do gráfico em 3D. As variáveis não significativas ($P > 0,05$) foram removidas progressivamente nos termos de ordens superiores pelo método *backward stepwise*. Os pressupostos foram checados quanto à normalidade dos dados nos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (Kéry and Hatfield, 2003). Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o *software* Statistica 7.0® (Stanford, 2005).

9. Resultados

O “*pool*” de sêmen criopreservado apresentou $70,11 \pm 4,11\%$ de espermatozoides normais. Motilidade e velocidade espermática oito segundos após a ativação dos espermatozoides de $53,06 \pm 15,16\%$ e $55,83 \pm 3,68 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ respectivamente. Com base nas equações geradas pelo modelo não linear as velocidades espermáticas de 20, 40 e $60 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ estavam nos tempos de 30,3; 15,9 e 10,9 segundos após a ativação dos espermatozoides, com as motilidades nestes tempos de 15,54; 51,21 e 65,76% respectivamente para as três velocidades (Figura 1). Através da equação do modelo não-linear calculamos a longevidade dos espermatozoides criopreservados, considerando $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ a velocidade mínima fertilizante, os mesmos permaneceram ativos por 56,3 segundos. Deste modo, nos respectivos ensaios com 20, 40 e $60 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, os espermatozoides permaneceram ativos e em contato com os ovos por 26,0; 40,4 e 45,4 segundos após a mistura.

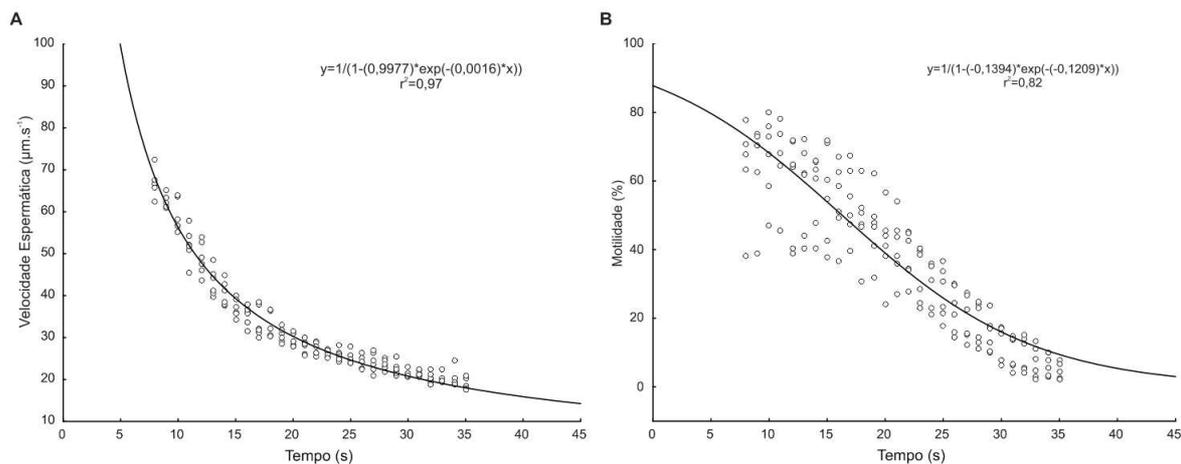


Figura 1) Curvas teóricas da cinética de ativação dos espermatozoides do sêmen criopreservado; A) Velocidade espermática ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), B) Motilidade (%).

O número de espermatozoides móveis e as velocidades espermáticas não apresentaram efeito ($p>0,05$) interativo. Por outro lado, de forma independente, a velocidade espermática influenciou ($p<0,05$) de forma linear as taxas de fertilização (Figura 2A) e de eclosão dos ovos (%) (Figura 2B), onde os espermatozoides mais velozes promoveram maiores taxas de sucesso reprodutivo.

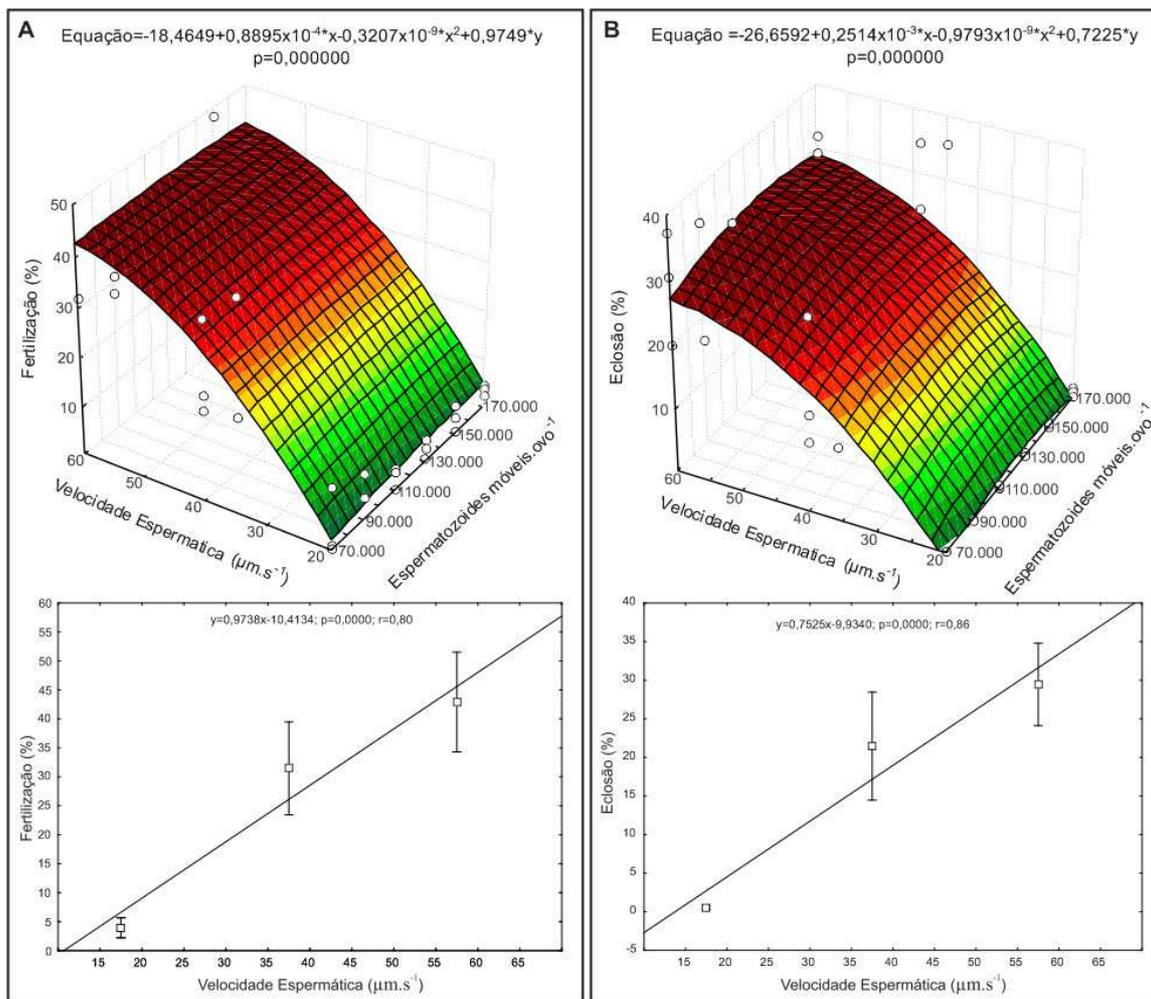


Figura 2. A) Fertilização (%) e B) eclosão (%) dos ovos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) fertilizados com sêmen criopreservado, testando três diferentes velocidades espermáticas e seis diferentes doses inseminantes.

De modo geral, tanto o número de espermatozoides móveis quanto a velocidade espermática não interferiram sobre as taxas de normalidade larvas ($p > 0,05$), as quais permaneceram acima de 86%.

A taxa média de fertilização dos ovos, de eclosão dos ovos e de normalidade larval proveniente do tratamento controle apresentaram taxas de $53,58 \pm 29,48\%$ de fertilização, $34,63 \pm 12,98\%$ de eclosão e $95,07 \pm 2,38\%$ de normalidade larval. Houve semelhança ($p > 0,05$) do tratamento controle com os ensaios utilizando as velocidades espermáticas de 40 e $60 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ para as taxas de fertilização e eclosão dos ovos (Tabela 01) constatado pelo teste de Dunnett. Ainda ocorreu semelhança ($p > 0,05$) do tratamento controle com todos os ensaios testados para as taxas de normalidade larval (Tabela 01) pelo teste de Dunnett.

Tabela 01 – Variáveis de fertilização (%), eclosão (%) e normalidade larval (%)

Espermatozoides móveis.ovócitos ⁻¹	VMD ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	Fertilização (%)	Eclosão (%)	Normalidade Larval (%)
90.000	-	53,58±29,48*	34,63±12,98*	95,07±2,38*
70.000	60	48,68±15,15*	29,61±8,76*	93,19±4,96*
70.000	40	25,73±9,68*	19,09±10,32*	94,38±3,14*
70.000	20	4,91±7,03	0,37±0,06	86,30±5,48*
90.000	60	36,76±12,84*	28,69±10,57*	94,27±2,75*
90.000	40	24,59±12,26*	12,67±6,38*	90,92±1,03*
90.000	20	7,22±3,66	0,15±0,06	100,00±0,00*
110.000	60	47,72±33,64*	34,28±17,81*	94,49±2,31*
110.000	40	34,53±22,00*	25,09±18,33*	95,41±3,31*
110.000	20	3,00±2,18	0,38±0,29	88,43±11,14*
130.000	60	43,12±19,89*	28,83±14,50*	92,05±1,54*
130.000	40	35,75±21,53*	24,94±23,94*	94,24±5,13*
130.000	20	2,69±1,92	0,66±0,23	87,45±10,93*
150.000	60	40,46±11,10*	29,27±12,18*	92,94±1,58*
150.000	40	32,57±19,95*	25,69±16,68*	93,61±1,90*
150.000	20	3,30±2,80	0,63±0,49	98,61±2,41*
170.000	60	39,86±9,63*	26,08±8,04*	92,48±3,75*
170.000	40	35,60±20,74*	21,31±12,65*	92,91±0,95*
170.000	20	3,68±1,08	1,15±0,68	89,45±8,31*

Dados representados por média \pm desvio padrão; * na mesma coluna indicam médias iguais ($p > 0,05$) entre os tratamentos e o controle, pelo teste de Dunnett.

10. Discussão

Os resultados do presente estudo evidenciaram que ao utilizar de 70.000 à 170.000 espermatozoides móveis por ovócito, não há diferença sobre o sucesso reprodutivo dos espermatozoides criopreservados. Hu *et al.*, (2014) também não encontraram diferença alguma ao utilizarem o dobro da proporção de espermatozoides móveis:ovócito recomendada para o bagre azul (*Ictalurus furcatus*).

De mesmo modo, Nynca *et al.*, (2014) ao utilizarem espermatozoides criopreservados de truta marron (*Salmo trutta m. fario* L.) na proporção recomendada a uma proporção dobrada de espermatozoide:ovócito para o sêmen fresco, não encontraram diferença sobre as taxas de embriões com olho e taxas de eclosão. Os autores (Nynca *et al.*, 2014) também não encontraram diferenças nos valores de velocidade curvilínea (VCL) entre o sêmen criopreservado e o sêmen fresco.

Em um estudo recente, Horváth *et al.*, (2015) encontrou resultados surpreendentes ao utilizar sêmen criopreservado de *Thymallus thymallus* com taxas de embriões com olho e eclosão semelhante ao controle quanto aplicada uma relação de $5,0 \times 10^4$ espermatozoides por ovócito,

relação está muito inferior a publicada anteriormente por Lahnsteiner *et al.*, (1996) para esta espécie, do qual sugere a utilização de $1,2-1,6 \times 10^6$ espermatozoides por ovócito para obter altas taxas de fertilização (90-100%).

Quando utilizada a relação mínima ou ótima de espermatozoides móveis por ovócito na fertilização artificial em peixes, o aumento desta proporção não acarreta em melhorias no sucesso reprodutivo. Esta relação é diversa e espécie específica (Butts *et al.*, 2009).

Provavelmente a redução da dose inseminante para 70.000 espermatozoides móveis.ovócito⁻¹ encontrada neste estudo foi possível por três motivos. Primeiro, porque foi corrigida a dose inseminante em função do percentual de células móveis. Segundo, devido ao fato do experimento conduzido por Bombardelli *et al.*, (2006) ter sido realizado a uma temperatura média de $22,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$, inferior a praticada no presente estudo. A temperatura pode ter interferido, pois Mehlis e Bakker (2014) afirmam que a relação espermatozoides:ovócito pode ser diminuída se aplicada uma temperatura de 25°C ao invés de 15°C , atingindo os mesmos resultados em termos de taxa de fertilização no *Gasterosteus aculeatus*. Esta temperatura elevada (25°C) prejudica o desempenho espermático em termos de taxa de motilidade, mas eleva a velocidade de natação dos espermatozoides, e não apresenta prejuízos em termos de longevidade espermática (Mehlis e Bakker, 2014; Sanches *et al.*, 2013b).

O terceiro motivo está relacionado com o processo de ativação espermática. Neste caso, o sêmen criopreservado foi ativado em água destilada que contém osmolaridade zero, ao diluir o sêmen criopreservado que continha $\frac{3}{4}$ de solução a 3.016mOsm diluída em 20mL de água destilada, a mesma esteve com uma osmolaridade próxima a 30,6mOsm no ensaio de fertilização, que proporciona uma maior eficiência espermática em relação a ativação em solução contendo zero de osmolaridade (Alavi e Cosson, 2005) como realizada por Bombardelli *et al.*, (2006).

A velocidade dos espermatozoides está altamente relacionada ao sucesso reprodutivo, onde os espermatozoides mais rápidos destacam-se sobre os mais lentos (Liljedär *et al.*, 2008; Gage *et al.*, 2004; Burness *et al.*, 2004). O espermatozoide com maior velocidade vai explorar o microambiente mais rapidamente e irá encontrar o seu destino mais cedo, encontrando e penetrando a micrópila do ovócito (Browne *et al.*, 2015; Liljedär *et al.*, 2008; Gage *et al.*, 2004). Porém em espermatozoides com velocidade semelhante entre si, a maior longevidade de alguns espermatozoides permitirá que ele percorra uma maior distância, cabendo a ele fertilizar os ovócitos restantes (Browne *et al.*, 2015) quando houver ovos a fertilizar e tempo. Contudo, a limitação dos recursos energéticos em espermatozoides de peixes (Alavi e Cosson, 2005) deve ser considerada, pois sugerem que espermatozoides mais velozes terão uma menor longevidade, devido ao gasto dos recursos energéticos disponíveis.

Portanto, a proporção entre espermatozoides velozes e lentos pode ser um fator determinante no sucesso reprodutivo, pois o maior número de espermatozoides lentos não necessariamente compensará a capacidade de fertilização de poucos espermatozoides rápidos. No presente estudo, as taxas de fertilização e eclosão não sofreram influência alguma do número de espermatozoides empregados, mas sim, foram influenciados pela velocidade espermática. Assim sendo, pode-se sugerir que a velocidade espermática é um importante fator de qualidade espermática, responsável pela fertilização dos ovócitos, quando empregada ao mínimo a relação recomendada de espermatozoides móveis para cada ovo a ser fertilizado. Estudos paralelos sobre a relação da qualidade espermática e a dose inseminante em baiacu (*Takifugu niphobles*) (Gallego *et al.*, 2013) tem encontrado resultados semelhantes.

A taxa de motilidade e as velocidades espermáticas decrescem rapidamente com o passar do tempo de ativação dos espermatozoides (Fauvel, Suquet e Cosson, 2010), onde a velocidade espermática depende da quantidade de energia disponível e do tempo após a ativação dos espermatozoides (Gillies *et al.*, 2013; Burness *et al.*, 2004). Com isso a maioria dos ovócitos é fertilizada nos primeiros segundos após a ativação dos gametas, quando a velocidade de natação espermática é elevada (Gallego *et al.*, 2013; Gage *et al.*, 2004; Burness *et al.*, 2004).

O sucesso dos procedimentos de reprodução artificial dependem de diversos parâmetros que podem influenciar as taxas de fertilização de forma independente ou interativa. Alguns dos principais fatores que interferem nas taxas de fertilização dos ovócitos são: a disponibilidade mínima de espermatozoides (Fauvel, Suquet e Cosson, 2010), a taxa de motilidade destes espermatozoides (Cosson *et al.*, 2008), a velocidade dos espermatozoides (Browne *et al.*, 2015; Liljedär *et al.*, 2008; Gage *et al.*, 2004) e o tempo pelo qual estas células permanecem móveis (Morita *et al.*, 2014).

A qualidade espermática se tornou um elemento essencial para alcançar as taxas de fertilização desejadas. Estes resultados sugerem que a velocidade espermática deve ser levada em conta como fator chave, tornando-se possível obter altas taxas de fertilização usando espermatozoides velozes ou modulando a velocidade dos mesmos com a utilização de soluções ativadoras, aumentando o seu potencial fertilizante.

O setor da aquicultura necessita de melhorias em algumas questões, principalmente no que diz respeito ao saber a mínima relação de espermatozoides móveis por ovócito, o efeito da modulação do movimento espermático, as características mínimas de qualidade espermática obtidas por meio de técnicas rápidas e eficientes e a disponibilização de palhetes de grande volume ou que contenham uma relação conhecida de espermatozoides para fertilizar uma quantidade razoável de ovócitos. A otimização destes parâmetros, certamente refletirá sobre a otimização da eficiência reprodutiva em procedimentos de fertilização artificial (Gallego *et al.*,

2013), reduzindo o número de machos e os custos de manutenção de estoques de reprodutores (Felizardo *et al.*, 2010).

Além disso, para consolidar o uso de sêmen criopreservado em escala comercial, é essencial a aplicação de doses espermáticas mínimas para cada ovócito, corrigidas conforme a sua qualidade em termos de células móveis e velocidade espermática.

11. Conclusão

Em rotinas de reprodução artificial do jundiá (*Rhamdia quelen*) que empregam sêmen criopreservado, a velocidade espermática mostrou-se como um fator determinante na capacidade dos espermatozoides em fertilizar os ovócitos. Além disso, o uso 70.000 espermatozoides móveis para cada ovócitos, com velocidade média de deslocamento igual ou superior a $40\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ garante o sucesso reprodutivo em termos de taxa de fertilização dos ovócitos, eclosão dos ovos e normalidade larval.

12. Referências

- Adames, M. S. 2014. Otimização da relação espermatozoide:ovócito empregando-se a frutose como modulador do movimento espermático em *Rhamdia quelen*. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca). Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 35p.
- Alavi, S. M. H. e Cosson, J. 2005. Sperm motility and fertilizing ability in the Persian sturgeon *Acipenser persicus*. *Aquaculture Research*. 36, 841-850.
- Amann, R. P.; Waberski, D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*. 81, 5-17.
- Arruda, R. P. 2000. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Barbas, J. P.; Mascarenhas, R. D. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Springer Science Business. Media B.V., v.10.
- Bobé, J.; Labbé, C. 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*. 165, 535-548.
- Bombardelli, R. A.; Morschbacher, E. F.; Campagnolo, R.; Sanches, E. A.; Syperreck, M. A. 2006. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). *Revista Brasileira de Zootecnia*. 35(4), 1251-1257.

- Boschetto, C.; Gasparini, C.; Pilastro, A. 2011. Sperm number and velocity affect sperm competition success in the guppy (*Poecilia reticulata*). Behavioral Ecology and Sociobiology. 65, 813-821.
- Browne, R. K.; Kaurova, S. A.; Uteshev, V. K.; Shishova, N. V.; McGinnity, D.; Figiel, C. R.; Mansour, N.; Agnew, D.; Wu, M.; Gakhava, E. N.; Dzyuba, B.; Cosson, J. 2015. Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians (Review). Theriogenology. 83, 1-13.
- Burness, G.; Casselman, S. J.; Schulte-Hostedde, A. I.; Moyer, C. D.; Montgomerie, R. 2004. Sperm swimming speed and energetics vary with sperm competition risk in bluegill (*Lepomis macrochirus*). Behav Ecol. Sociobiol. 56, 65-70.
- Butts, I. A. E.; Feindel, N.; Neil, S.; Kovacs, E.; Urbanyi, B.; Truppel, E. A. 2011. Cryopreservation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) sperm in large-volume straws: applications for commercial production and gene banking. Aquaculture. 42, 1714-1722.
- Butts, I. A. E.; Trippel, E. A.; Litvak, M. K. 2009. The effect of sperm to egg ratio and gamete contact time on fertilization success in Atlantic cod *Gadus morhua* L. Aquaculture. 286, 89-94.
- Cabrita, E.; Robles, V.; Alvarez, R.; Herraéz, M. P. 2001. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. Aquaculture. 201, 301-314.
- Cabrita, E.; Robles, V.; Sarasquete, C.; Herráez, P. 2011. New insight on sperm quality evaluation for broodstock improvement. In: Cryopreservation in Aquatic Species, 2nd Edition. Tiersch, T. R.; Green, C. C. editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. Pp. 146-161.
- Castelo, T. S. 2010. Efeito dos processos de centrifugação, diluição e descongelamento sobre a qualidade do sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758). Dissertação (Mestrado e Sanidade Animal). Universidade Federal do Semi-Árido. 100p.
- Cosson, J.; Groison, A. -L.; Suquet, M.; Fauvel, C.; Dreanno, C.; Billard, R. 2008. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. J. Appl. Ichthyol. 24, 460-486.
- Fauvel, C.; Suquet, M.; Cosson, J. 2010. Evaluation of fish sperm quality. Journal of Applied Ichthyology. 26, 636-643.
- Felizardo, V. O.; Murgas, L. D. S.; Drumond, M. M.; Silva, J. A. 2010. Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócitos de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Ver. Cers, Viçosa. 57(5), 648-652.
- Gage, M. J. G.; Macfarlane, C. P.; Yeates, S.; Ward, R. G.; Searle, J. B.; Parker, G. A. 2004. Spermatozoal Traits and Sperm Competition in Atlantic Salmon: Relative Sperm Velocity is the Primary Determinant of Fertilization Success. Current Biology. 14, 44-47.
- Gallego, V.; Pérez, L.; Asturiano, J. F.; Yoshida, M. 2013. Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). Aquaculture. 416-417, 238-243.

- Gasparini, C.; Simmons, L. W.; Beveridge, M.; Evans, J. P. 2010. Sperm Swimming Velocity Predicts Competitive Fertilization Success in the Green Swordtail *Xiphophorus helleri*. Plos One. 5(8), e12146.
- Gillies, E. A.; Bondarenko, V.; Cosson, J.; Pacey, A. A. 2013. Fins improve the swimming performance of fish sperm: a hydrodynamic analysis of the Siberian Sturgeon *Acipenser baerii*. Cytoskeleton. 70, 85-100.
- Horváth, Á.; Bokor, Z.; Bernáth, G.; Csenki, Z.; Gorjan, A.; Herráez, M. P.; Urbányi, B.; Jesenek, D. 2015. Very low sperm-egg ratios result in successful fertilization using cryopreserved sperm in the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*). Aquaculture. 435, 75-77.
- Hu, E.; Bosworth, B.; Baxter, J.; Tiersch, T. R. 2014. On-site evaluation of commercial-scale hybrid catfish production using cryopreserved blue catfish sperm. Aquaculture. 426-427, 88-95.
- Jeziarska, B.; Lugowska, K.; Witeska, M. 2009. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). Fish Physiol Biochem. 35, 625-640.
- 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.
- Kéry, M.; e Hatfield, J. S. 2003. Normality of Raw data in general linear models: the most widespread myth in Statistics. Conservation Ecology. 4, 92-94.
- Khara, H.; Baradaran, S. N.; Hadiseh, D.; Rahbar, M.; Ahmadnejad, M.; Khodadoost, A. 2012. The effect of cations on sperm motility performance and fertilizing ability of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. Acta Veterinaria (Beograd). 62(5-6), 599-609.
- Koakoski, G.; Oliveira, T. A.; da Rosa, J. G. S.; Fagundes, M.; Kreutz, L. C.; Barcellus, L. J. G. 2012. Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages. Physiology & behavior. 106, 129-132.
- Lahnsteiner, F.; Weismann, T.; Patzner, R. 1996. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). Aquaculture. 144, 265-274.
- Lehnert, S. J.; Heath, D. D.; Pitcher, T. E. 2012. Sperm trait differences between wild and farmed Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Aquaculture. 344-349, 242-247.
- Liljedal, S.; Rudolfson, G.; Folstad, I. 2008. Factors predicting male fertilization success in natural external fertilization. Behav. Ecol. Sociobiol. 62, 1805-1811.
- Linhart, O.; Alavi, S. M. H.; Rodina, M.; Gela, D.; Cosson, J. 2008. Comparison of sperm velocity, motility and fertilizing ability between first and second activated spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Applied Ichthyology. 24, 386-392.
- Martínez-Páramo, S.; Diogo, P.; Dinis, M. T.; Herráez, M. P.; Sarasquete, C.; Cabrita, E. 2012. Sea bass sperm freezability is influenced by motility variables and membrane lipid composition but not by membrane integrity and lipid peroxidation. Animal Reproduction Science. 131, 211-218.

- Mehlis, M. e Bakker, T. C. M. 2014. The influence of ambiente water temperature on sperm performance and fertilization success in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Evol. Ecol.* 28, 655-667.
- Morita, M.; Awata, S.; Yorifuji, M.; Ota, K.; Kohda, M.; Ochi, H. 2014. Bower-building behaviour is associated with increased sperm longevity in Tanganyikan cichlids. *Journal of Evolutionary Biology.* 27, 2629-2643.
- Neumann, G, 2012. Frutose como ativador e crioprotetor espermático de Surubim do Iguaçú (*Steindachneridion melanodermatum*). Monografia – Faculdade de Engenharia de Pesca, Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Toledo, PR. 38p.
- Neumann, G.; Bombardelli, R. A.; Sanches, E. A.; Toledo, C. P. R. 2013. Análise espermática computadorizada em peixes de água doce: procedimentos para uso do aplicativo CASA em *software* livre. Toledo, PR – Brasil. 1º. ed. ISBN: 978-85-603-0840-8. 86p.
- Nynca, J.; Dietrich, G. J.; Dobosz, S.; Grudniewska, J.; Ciereszko, A. 2014. Effect of cryopreservation on sperm motility parameters and fertilizing ability of brown trout sêmen. *Aquaculture.* 433, 62-65.
- Pereira, C. R.; Barcellos, L. J. G.; Kreutz, L. C.; Quevedo, R. M.; Ritter, F.; Silva, L. B. 2006. Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a south American Catfish. *Braz. J. Biol.* 66(4), 1057-1062.
- Robles, V.; Cabrita, E.; Cuñado, S.; Herráez, M. P. 2003. Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. *Aquaculture.* 224, 203-212.
- 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.
- Saches, E. A.; Neumann, G.; Toledo, C. P. R. de.; Bombardelli, R. A.; Piana, P. A.; Romagosa, E. 2013b. Temperature and storage period over spermatic parametr of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Aquaculture Research.* 44, 534-541.
- Sanches, E. A.; Marcos, R. M.; Okaware, R. Y.; Caneppele, D.; Bombardelli, R. A.; Romagosa, E. 2013. Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. *J. Appl. Ichthyol.* 29, 1114-1122.
- Sanches, E. A.; Neumann, G.; Baggio, D. M.; Bombardelli, R. A.; Piana, P. A.; Romagosa, E. 2011. Time and temperature on the storage of oocytes from jundiá catfish, *Rhamdia quelen*. 319, 453-458.
- Smith, C. C. 2012. Opposing effects of sperm veability and velocity on the outcome of sperm competition. *Behavioral Ecology.* 23(4), 820-826.
- Stanford. INC. 2005. Statistica (data analysis software system). Version 7.0. Tulsa, USA.

- Stoltz, J. A.; Neff, B. D. 2006. Sperm competition in a fish with external fertilization: the contribution of sperm number, speed and length. *Journal Compilation. European Society for Evolutionary Biology*. 19, 1873-1881.
- Tessaro, L.; Toledo, C. P. R. de.; Neumann, G.; Krause, R. A.; Meurer, F.; Natali, M. R. M.; Bombardelli, R. A. 2012. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed on diferente digestible energy levels in the reproductive phase. *Aquaculture*. 326-329, 74-80.
- Valdebenito, N. I. 2007. Efecto de la Cafeína em la motilidade y fertilidade espermática de Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). *Información Tecnológica*. 18(2), 61-65.
- Viveiros, A. T. M.; Leal, M. de C.; Sallum, W. B. 2011. Reprodução da Principais Espécies de Peixes Nativos. Lavras, MG, UFLA/FAEPE. 94p.
- Viveiros, A. T. M.; Nascimento, A. F.; Orfão, L. H.; Isaú, Z. A. 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*. 74, 551-556.
- Viveiros, A. T. M.; Orfão, L. H.; Nascimento, A. F.; Corrêa, F. M.; Caneppele, D. 2012. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). *Theriogenology*. 78, 361-368.
- Wang, X.; Wang, F.; Wu, X.; Zhao, X.; Liu, J.; Huang, C.; Dong, Q. 2010. The use of cryomicroscopy in guppy sperm freezing. *Cryobiology*. 61, 182-188.

13. Considerações finais

Os resultados deste trabalho permitem a realização de algumas considerações a respeito do uso do CASA para avaliação andrológica em peixes:

a) Apesar da eficácia do CASA para avaliação dos parâmetros espermáticos e a grande aceitação deste método pela comunidade científica, novas pesquisas devem ser desenvolvidas para buscar a melhor compreensão das variáveis geradas por este sistema para garantir a correta interpretação dos resultados e da qualidade espermática.

b) O emprego do CASA, associado com procedimentos de modelagem matemática permitem a elaboração de modelos de predição que possibilitam a otimização dos estudos espermáticos.

c) Apesar da densidade e de as taxas de motilidade espermáticas serem convencionalmente estabelecidas como parâmetros significativos para o sucesso da reprodução artificial, é possível afirmar que a velocidade espermática é um parâmetro mais importante que o número de espermatozoides móveis presente no meio fertilizante, onde espermatozoides mais rápidos possuem maiores chances de concluir o processo de fertilização dos ovócitos.

d) O emprego de 70.000 a 170.000 espermatozóides móveis:ovócito não interferiu no sucesso da fertilização artificial dos ovócitos do jundia (*Rhamdia quelen*). Portanto, a demanda por espermatozóides móveis (SPZ) em rotinas de reprodução artificial com sêmen criopreservado pode ser igual ou inferior a 70.000 SPZ:ovócito. Contudo, densidades espermáticas fora dos intervalos estudados nesta pesquisa ainda devem ser testadas.

e) O meio científico necessita de estudos mais aprofundados em relação existente entre as variáveis geradas pelo CASA e seus efeitos sobre a fertilidade dos espermatozoides de peixes.

14. Apêndices



Figura 1: Viveiros escavados utilizados para estocagem dos reprodutores. Destaque para procedimento de captura e seleção dos animais.



Figura 2: Parte da equipe técnica em procedimento de seleção de reprodutores e matrizes.



Figura 3: Exemplo de Jundiá cinza (*Rhamdia quelen*).



Figura 4: Procedimentos empregado para manipulação hormonal para sincronização da ovulação e da espermição. Destaque para injeção intramuscular na região dorsal.



Figura 5: Laboratório de Tecnologia da Reprodução de Animais Aquáticos, instalado no Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Destaque para o sistema experimental de incubação dos ovos.



Figura 6: Procedimento empregado para realização da coleta de sêmen, por meio de massagem abdominal dos reprodutores de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*).



Figura 7: Procedimento empregado para realização da coleta de ovócitos, por meio de massagem abdominal das matrizes de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*).



Figura 8: Procedimentos empregados para criopreservação do sêmen. A) Diluição do sêmen em solução crioprotetora; B) Procedimento empregado para envase do sêmen diluído em palhetes de 0,25mL; C) Detalhe do botijão de vapor de nitrogênio; D) Detalhe do botijão de nitrogênio líquido.



Figura 9: Laboratório de Tecnologia da Reprodução de Animais Aquáticos, instalado no Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Destaque para o procedimento de análise espermática pelo *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA).

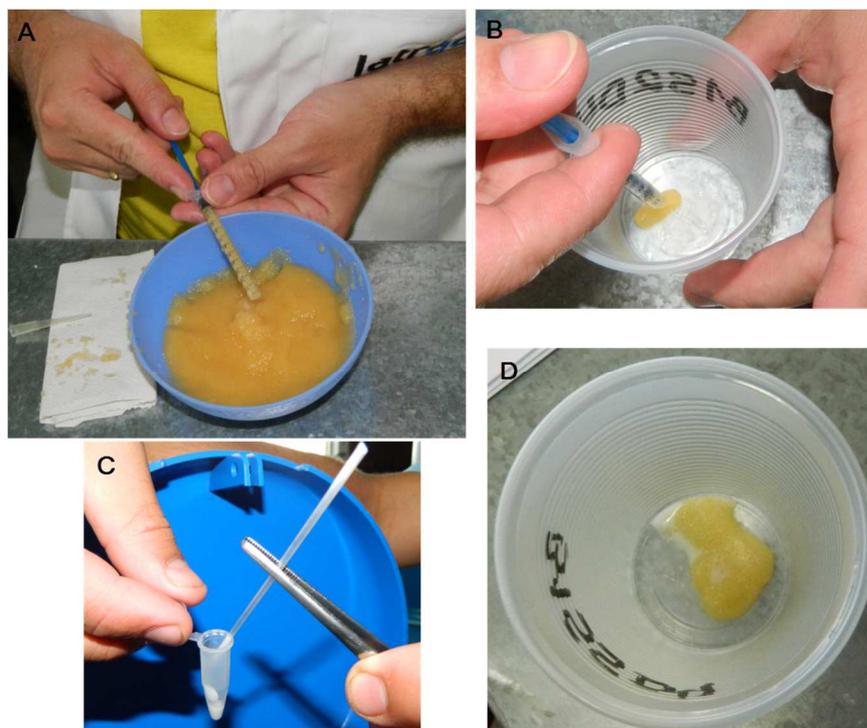


Figura 9: Procedimento experimental empregado para realizar a fertilização artificial dos ovócitos. A e B) Amostragem dos ovócitos; C) Obtenção de alíquotas de sêmen criopreservado; D) Detalhe das amostras de ovócitos e de sêmen de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*), previamente à ativação dos gametas utilizado no tratamento controle.



Figura 10: Larvas de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) submetidas aos procedimentos de avaliação da normalidade larval.