

PEDRO NACIB JORGE NETO

Colheita e criopreservação de sêmen de elasmobrânquios

São Paulo
2023

PEDRO NACIB JORGE NETO

Colheita e criopreservação de sêmen de elasmobrânquios

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Cristiane Schilbach Pizzutto

São Paulo

2023

RESUMO

JORGE NETO, P. N. **Colheita e criopreservação de sêmen de elasmobrânquios**. 2023. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Elasmobrânquios apresentam características únicas nos seus espermatozoides, notavelmente distintas das de peixes ósseos, e a compreensão da andrologia destas espécies é escassa. A ausência de protocolos padronizados para a avaliação do sêmen desses animais, desde a ativação até a análise por meio do sistema CASA, representa uma lacuna significativa no conhecimento científico. O propósito deste estudo consistiu na elaboração de um protocolo específico para a avaliação de espermatozoides de elasmobrânquios utilizando o sistema CASA, na validação de um meio quimicamente definido para a ativação espermática e na investigação da viabilidade de diluentes para a criopreservação, comparando os crioprotetores DMSO e metanol. Amostras de sêmen de diversas espécies de raias e tubarões foram coletadas no Aquário de São Paulo e no Aquário Marinho do Rio de Janeiro. A configuração do sistema CASA foi desenvolvida utilizando sêmen de raias *Potamotrygon* e subsequentemente validada em raias marinhas e tubarões, empregando as ferramentas do sistema IVOS II. A ativação espermática foi inicialmente avaliada em águas com diferentes níveis de salinidade, posteriormente utilizando o ativador comercial Actifish. Quanto à criopreservação, foram testados os diluentes Freezefish e INRA, associados ao DMSO e ao metanol. Os resultados demonstraram sucesso na descrição e validação do protocolo, revelando diferenças na ativação espermática entre as espécies conforme as áreas de reprodução, tais como estuários ou ambientes marinhos. Notavelmente, o meio comercial Actifish demonstrou eficiência na ativação espermática. Este estudo estabeleceu um padrão para a avaliação do sêmen de 14 espécies distintas de elasmobrânquios, cujos espermatozoides apresentam morfologia de cabeça helicoidal, utilizando o sistema CASA. Este avanço representa um passo fundamental no desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas voltadas para a conservação de elasmobrânquios. Além disso, evidenciou-se que a salinidade exerce influência significativa na ativação espermática, sendo que as condições ideais correspondem aos ambientes naturais de reprodução, como estuários ou ambientes marinhos. A adoção do meio comercial Actifish se apresenta como uma alternativa altamente viável, substituindo soluções salinas não-padronizadas. Entretanto, é fundamental aprofundar as investigações, especialmente em espécies nas quais a ativação espermática ainda não foi eficientemente estabelecida. A criopreservação do sêmen de elasmobrânquios requer futuros estudos para determinar os

diluentes e crioprotetores ideais. Nossos resultados iniciais sugerem que meios derivados de mamíferos podem oferecer maior promessa do que aqueles derivados de peixes ósseos, e o DMSO demonstra ser um crioprotetor intracelular mais eficaz em relação ao metanol. Essas conclusões proporcionam uma base sólida para a pesquisa contínua nesse campo crucial da biologia reprodutiva de elasmobrânquios.

Palavras-chave: Selachii; Batoidea; raia; tubarão; biobanco

ABSTRACT

JORGE NETO, P. N. **Elasmobranchs semen collection and cryopreservation**. 2023. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Elasmobranchs exhibit unique characteristics in their spermatozoa, notably distinct from those of bony fishes, and our understanding of the andrology of these species is limited. Furthermore, the absence of standardized protocols for semen evaluation, from activation to analysis using the CASA system, represents a significant gap in scientific knowledge. The purpose of this study was to develop a specific protocol for the assessment of elasmobranch spermatozoa using the CASA system, validate a chemically defined medium for sperm activation, and investigate the feasibility of cryopreservation extenders by comparing the cryoprotectants DMSO and methanol. Semen samples from various species of rays and sharks were collected at the São Paulo Aquarium and the Rio de Janeiro Marine Aquarium. The CASA system configuration was developed using semen from *Potamotrygon* rays and subsequently validated in marine rays and sharks using the IVOS II system tools. Sperm activation was initially assessed in waters with different salinity levels and later with the commercial activator Actifish. Regarding cryopreservation, Freezefish and INRA extenders were tested, associated with DMSO and methanol cryoprotectants. The results successfully described and validated the protocol, revealing differences in sperm activation among species depending on their reproductive areas, such as estuaries or marine environments. Importantly, the commercial medium Actifish demonstrated efficiency in sperm activation. This study established a standard for evaluating the semen of 14 distinct elasmobranch species with spermatozoa exhibiting helical head morphology using the CASA system. This advancement represents a crucial step in the development of reproductive biotechnologies aimed at the conservation of elasmobranchs. Additionally, it highlighted the significant influence of salinity on sperm activation, with ideal conditions corresponding to natural reproduction environments such as estuaries or marine settings. The adoption of the commercial medium Actifish emerges as a highly viable alternative, replacing non-standardized saline solutions. Nevertheless, further investigations are essential, particularly for species where sperm activation has not been efficiently established. Cryopreservation of elasmobranch semen necessitates future studies to determine ideal extenders and cryoprotectants. Our initial findings suggest that mammalian-derived media may hold greater promise than those derived from bony fishes, with DMSO demonstrating superior

intracellular cryoprotection compared to methanol. These conclusions provide a robust foundation for ongoing research in this critical field of elasmobranch reproductive biology.

Keywords: Selachii; Batoidea; stingray; shark; biobank