

SOFIA DRESSEL RAMOS

**Análise e criopreservação de sêmen de raias do gênero
*Potamotrygon***

São Paulo

2021

SOFIA DRESSEL RAMOS

**Análise e criopreservação de sêmen de raias do gênero
*Potamotrygon***

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Cristiane Schilbach Pizzutto

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4101 FMVZ	Ramos, Sofia Dressel Análise e criopreservação de sêmen de raias do gênero <i>Potamotrygon</i> / Sofia Dressel Ramos. – 2021. 73 f. : il.
	Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2021.
	Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
	Área de concentração: Reprodução Animal.
	Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Schilbach Pizzutto.
	1. <i>Potamotrygon falkneri</i> . 2. <i>Potamotrygon motoro</i> . 3. Reprodução. 4. Espermatozoide. 5. Conservação. I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise e criopreservação de sêmen de raias do gênero *Potamotrygon*", protocolada sob o CEUA nº 2227140521 (ID 008866), sob a responsabilidade de **Cristiane Schilbach Pizzutto** e equipe; *Sofia Dressel Ramos* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 27/05/2021.

We certify that the proposal "Analysis and cryopreservation of *Potamotrygon* stingray semen", utilizing 8 Fishes (8 males), protocol number CEUA 2227140521 (ID 008866), under the responsibility of **Cristiane Schilbach Pizzutto** and team; *Sofia Dressel Ramos* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/27/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **06/2021** a **12/2021** Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Peixes**

sexo: **Machos**

idade: **1 a 6 anos**

N: **8**

Linhagem: **Potamotrygon**

Peso: **500 a 4000 kg**

Local do experimento: **Aquário de São Paulo**

São Paulo, 27 de maio de 2021

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RAMOS, Sofia Dressel

Título: **Análise e criopreservação de sêmen de raias do gênero *Potamotrygon***

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico meu trabalho aos animais, pois sinto a responsabilidade e o compromisso de garantir a existência, perpetuação e bem-estar das espécies com as quais coexistimos.

Dedico este trabalho especialmente às raias de água doce, animais tão peculiares que tive o prazer de conhecer e estudar ao longo deste projeto de mestrado. Desejo que as informações reunidas nesta dissertação ajudem outros pesquisadores a conduzirem mais trabalhos e estudos em prol da conservação destes espécimes ainda tão pouco compreendidos e já tão ameaçados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Marlis Dressel e Herblay Ramos, que sempre são os maiores incentivadores em todas as etapas e escolhas da minha vida. Muito obrigada por sempre acreditarem em mim e fazerem absolutamente tudo que está ao alcance para me proporcionarem suporte e conforto, estando sempre ao meu lado apesar da distância física.

À Gummy, companheira canina presente em todas as madrugadas de estudo, pesquisa e escrita deste trabalho. Agradeço pelo acolhimento e suporte emocional tão essenciais durante essa jornada acadêmica longe da família e em meio a uma pandemia.

Agradeço ao Ronald Carvalho Neto, meu parceiro de vida. Obrigada por estar sempre ao meu lado, por me ouvir, apoiar, aconselhar e ajudar a ver o lado bom da vida.

À Cristiane Schilbach Pizzutto, minha orientadora nessa aventura chamada Mestrado. Obrigada por aceitar este projeto desafiador, por me ajudar a abrir tantas portas e contornar tantos obstáculos, sempre mantendo uma postura correta e serena. Ainda tenho muito a aprender contigo!

À Maíra Morales Brito, amiga desde os tempos da graduação, por me auxiliar antes mesmo de iniciar o mestrado. Obrigada por me ajudar prontamente sempre que precisei de auxílio com os procedimentos relativos à pós graduação.

Ao George Shigueki Yasui, pelas dicas dadas durante a banca de qualificação e ao longo da execução deste projeto que ainda está rendendo novas etapas.

Ao Aquário de São Paulo por fornecer os animais deste estudo. Obrigada a todos os colaboradores da instituição que cederam seu tempo e trabalho para realizar as colheitas de material, em especial Fabiana Lúcia André Padilha, Rafael Caprioli Gutierrez e à Helen Colbachini que também auxiliou nas análises estatísticas.

Agradeço à IMV Technologies por conceder espaço no laboratório, participação dos colaboradores, utilização dos equipamentos e fornecimento dos insumos laboratoriais necessários para avaliação espermática. Agradeço ao Pedro Nacib Jorge Neto, que encabeçou todos os processos das análises espermáticas e ainda está auxiliando na publicação dos resultados obtidos. Um agradecimento especial ao Fabio

de Moraes Francisco, por auxiliar na execução das análises e na configuração do CASA, e à Emanuele Almeida Gricio, por dar continuidade às avaliações diárias da motilidade.

Ao Laboratório de Andrologia, em especial ao Professor Marcílio Nichi e alunos Raphaela Gabrielle Brito Souza, Roberta Ferreira Leite e João Diego de Agostini Losano, por ajudarem nas etapas iniciais do projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Do ponto de vista dos animais, não importa o que pensamos ou sentimos,
mas o que fazemos.” (Webster 1993)*

RESUMO

RAMOS, S. D. **Análise e criopreservação de sêmen de raias do gênero *Potamotrygon***. 2021. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Os estudos sobre reprodução de raias do gênero *Potamotrygon* em ambiente natural são muito dificultados pelo habitat e hábitos de vida destes animais. Apesar de serem bastante apreciadas e criadas por aquaristas e hobbistas, a literatura científica a respeito da reprodução destes animais é escassa e faltam estudos a respeito de questões reprodutivas básicas como avaliação espermática. Este trabalho teve como objetivo fazer uma revisão de literatura a respeito da reprodução das raias de água doce, com principal enfoque para o sistema reprodutor masculino; avaliar e comparar a motilidade espermática de duas espécies de *Potamotrygon* em dois diferentes diluentes; bem como testar esses dois diluentes para criopreservação do sêmen. Foram utilizados quatro indivíduos machos de *Potamotrygon falkneri* e quatro *Potamotrygon motoro* mantidos sob os cuidados do Aquário de São Paulo, Brasil. Foi realizada colheita de sêmen e a motilidade dos espermatozoides avaliada por sistema computadorizado (CASA) nos diluentes INRA 96 e Optixcell no dia zero, ao longo de 18 dias e pós descongelação. Os espermatozoides apresentaram grande longevidade mantidos somente sob refrigeração. Não foram encontradas diferenças significativas entre *P. falkneri* e *P. motoro* em relação à motilidade espermática. Os diluentes não mostraram diferença significativa na motilidade, mas o INRA adicionado de DMSO para criopreservação apresentou aumento de até 247% da motilidade pós descongelação, sugerindo que este diluente tenha algum tipo de efeito sobre a capacitação espermática de potamotrygonídeos.

Palavras-chave: *Potamotrygon falkneri*. *Potamotrygon motoro*. Reprodução. Espermatozoide. Conservação.

ABSTRACT

RAMOS, S. D. **Analysis and cryopreservation of semen from stingrays of the genus *Potamotrygon***. 2021. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Reproduction studies of stingrays of the genus *Potamotrygon* in a natural environment are very difficult to run, due to the habitat and life habits of these animals. Despite being highly appreciated and raised by aquarists and hobbyists, scientific literature on the reproduction of these animals is scarce and studies on basic reproductive issues, such as sperm evaluation, are lacking. The aim of this study was to review the literature on the reproduction of freshwater stingrays, focusing on the male reproductive system; evaluate and compare the sperm motility of two *Potamotrygon* species in two different diluents; as well as testing these two diluents for semen cryopreservation. Four male *Potamotrygon falkneri* and four male *Potamotrygon motoro* kept in São Paulo Aquarium, Brazil, were used. Semen collection was performed and sperm motility was evaluated by a computerized system (CASA) in INRA 96 and Optixcell diluents on day zero, throughout 18 days and after thawing. Sperm showed great longevity maintained only under refrigeration. The sperm motility did not differ between *P. falkneri* and *P. motoro*. The diluents showed no significant difference in motility, but cryopreservation using INRA + DMSO solution showed an increase of up to 247% in post-thawing motility, suggesting that this diluent solution has some kind of effect on the sperm capacitation of potamotrygonids.

Keywords: *Potamotrygon falkneri*. *Potamotrygon motoro*. Reproduction. Spermatozoon. Conservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático do sistema reprodutor masculino de raias do gênero <i>Potamotrygon</i>	28
Figura 2 - Desenho esquemático do desenvolvimento dos folículos seminíferos no testículo de estrutura radial	29
Figura 3 - Cartilagens do clássper de um potamotrygonídeo	32
Figura 4 - Desenho esquemático da região pélvica de um macho maduro	33
Figura 5 - Diagrama esquemático da espermatogênese em <i>Potamotrygon</i>	34
Figura 6 - Espermatozoide de <i>Potamotrygon</i> (aumento de 1.000x)	35
Figura 7 - Espermatozeugmata e agregados de espermatozoides em <i>Potamotrygon</i> (aumento de 400x)	36
Figura 8 - Desenho esquemático da massagem para colheita de sêmen em <i>Potamotrygon</i>	41
Figura 9 - Posicionamento do animal e biometria	45
Figura 10 - Esquema de dados biométricos	46
Figura 11 - Formação de grumos dentro da palheta	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados biométricos	49
Tabela 2 - Motilidade média diária	54
Tabela 3 - Porcentagem de motilidade pós descongelação	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Correlação entre motilidade no INRA no dia zero com peso e largura do disco.....	50
Gráfico 2 - Correlação entre motilidade no Optixcell no dia zero com peso e largura do disco.....	51
Gráfico 3 - Gráficos boxplot e violinplot da motilidade em relação à temperatura no diluente INRA	51
Gráfico 4 - Gráficos boxplot e violinplot da motilidade em relação à temperatura no diluente Optixcell	52
Gráfico 5 - Gráficos boxplot e violinplot da motilidade no dia zero em relação ao diluente	53
Gráfico 6 - Valores médios de motilidade espermática nos diluentes INRA e Optixcell	53
Gráfico 7 - Gráficos boxplot e violinplot da motilidade em relação à espécie no diluente INRA	55
Gráfico 8 - Gráficos boxplot e violinplot da motilidade em relação à espécie no diluente Optixcell	55
Gráfico 9 - Gráficos boxplot e violinplot da motilidade no INRA com DMSO pré e pós congelação	56
Gráfico 10 - Gráficos boxplot e violinplot da motilidade no Optixcell pré e pós congelação.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Identificação dos animais do experimento	43
Quadro 2 - Tanques de manutenção dos animais	44
Quadro 3 - Dados biométricos	46
Quadro 4 - Diluição do sêmen para avaliação no sistema CASA	47
Quadro 5 - Aspecto macroscópico do sêmen	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	18
2.2	CONSERVAÇÃO E O IMPACTO HUMANO	19
2.3	FISIOLOGIA	22
2.4	CICLO REPRODUTIVO.....	23
2.5	BIOLOGIA REPRODUTIVA DA FÊMEA	25
2.6	ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTIVO MASCULINO	26
2.7	ESPERMATOZOIDES	34
2.8	REPRODUÇÃO ASSISTIDA	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1	ANIMAIS E AMBIENTE	43
3.2	BIOMETRIA E COLHEITA DE SÊMEN	44
3.3	AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA	47
3.4	CRIOPRESERVAÇÃO	48
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
4	RESULTADOS	49
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICES	72

1 INTRODUÇÃO

As raias de água doce do gênero *Potamotrygon* são exclusivas da América do Sul. Elas não são capazes de viver em água salgada e costumam ficar nos fundos dos rios, possuindo também o hábito de se enterrar. Esse estilo de vida somado à turbidez das águas são fatores que dificultam a visualização e estudos com estes animais (GARRONE NETO; UIEDA, 2012). Ainda são recentes as descrições de novas espécies (DE CARVALHO, 2016), principalmente na bacia amazônica, que possui áreas alagadas e locais de acesso muito difícil. Mesmo assim esses peixes estão sofrendo com a poluição dos rios, pesca e tráfico de animais silvestres. Dessa forma existe o risco de extinguir espécies antes mesmo de serem corretamente classificadas (RINCON FILHO, 2006).

A manutenção de exemplares em cativeiro é grande aliada para a conservação em vida livre, pois facilita muito o acesso a materiais biológicos e observação do comportamento. A reprodução é um quesito muito importante para a manutenção de espécimes sob cuidados humanos e é preciso conhecer aspectos reprodutivos básicos para poder então desenvolver e aplicar biotecnologias reprodutivas de forma eficiente.

A reprodução de raias de água doce em cativeiro é bem comentada entre aquaristas e hobbistas em meios de divulgação não acadêmicos, fazendo com que informações de fontes amadoras se disseminem rapidamente. Enquanto isso, os trabalhos feitos por profissionais da área acadêmica caminham lentamente em relação a estes peixes, constatado pela escassez de relatos em literatura científica.

Alguns pesquisadores têm mostrado avanços em relação à reprodução assistida em elasmobrânquios, com utilização de técnicas envolvendo exame ultrassonográfico, dosagens hormonais e avaliação espermática (DALY; JONES, 2017). Apesar disso, essas técnicas ainda não foram bem validadas nos *Potamotrygonídeos*, que possuem diferenças fisiológicas e ecológicas bastante peculiares em relação aos peixes cartilaginosos marinhos. Dessa forma, ainda são necessários estudos sobre questões reprodutivas básicas a fim de que uma metodologia de reprodução assistida eficiente seja definida para raias do gênero *Potamotrygon*.

Este trabalho tem como objetivo fazer uma revisão de literatura a respeito da reprodução das raias de água doce, com principal enfoque para o sistema reprodutor

masculino; avaliar e comparar a motilidade espermática de duas espécies de *Potamotrygon* em dois diferentes diluentes; bem como testar esses dois diluentes para criopreservação do sêmen.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

Os Potamotrygonídeos são o grupo de elasmobrânquios mais bem adaptados à água doce e possuem mais de 25 espécies classificadas (BALLANTYNE; ROBINSON, 2010). Existe um outro grupo de raias de água doce encontrado na Ásia, África e Austrália, que é composto por algumas espécies da família Dasyatidae (TANIUCHI; ISHIHARA, 1990), mas apesar de ambas as famílias fazerem parte da ordem Myliobatiformes (INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM, 2014), a família Potamotrygonidae é restrita à América do Sul e é dividida em três gêneros: *Paratygon*, *Plesiotrygon* e *Potamotrygon* (TANIUCHI; ISHIHARA, 1990; ARAÚJO et al., 2004).

Durante muitas décadas a classificação desses animais foi feita de forma visual, com base em dados de biometria, análise de arcada dentária, avaliação de radiografias e, principalmente, caracterização do padrão de manchas (DE CARVALHO, 2016). Isso fez com que potamotrygonídeos desenvolvessem um histórico taxonômico problemático (GARRONE NETO; HADDAD JUNIOR, 2010) que se arrasta até os tempos atuais, necessitando de uma série de revisões e correções.

A identificação visual das raias de água doce é difícil porque o policromatismo é uma importante característica do gênero *Potamotrygon*, ou seja, uma mesma espécie pode apresentar diferentes padrões de coloração (ARAÚJO et al., 2004; RINCON FILHO, 2006). Para complicar ainda mais a situação, Rincon Filho (2006) adicionou como fatores que prejudicaram a taxonomia e a biogeografia do grupo: descrições superficiais, antigas, equivocadas e baseadas em poucos exemplares, perda de material, falta de informações precisas de coleta e revisões confusas. Reynolds et al. (2017) afirmaram também que hoje há muitos animais híbridos por conta da indústria de peixes ornamentais.

Rincon Filho (2006) sinalizou que parâmetros reprodutivos já foram usados como ferramenta taxonômica, mas que estes dados também são incertos, pois podem variar entre diferentes regiões. Ele ainda enumerou outras questões problemáticas a respeito do trabalho da identificação taxonômica como dificuldade de identificação do material coletado, grande porte dos animais que dificulta sua preservação e transporte

para posterior análise e falta de pesquisadores especialistas na área para identificar corretamente as espécies encontradas em atividades de campo.

Atualmente os avanços no campo da genética têm apresentado novas descobertas a respeito das classificações das espécies. Diaz et al. (2016) mostraram um estudo genético que coloca em dúvida a atual classificação do gênero *Potamotrygon* da região do baixo rio Paraná. Em seus resultados eles mostraram divergências genéticas que não somente apontam para uma classificação errônea dos animais, como também sugerem a existência de novas espécies ainda não conhecidas.

2.2 CONSERVAÇÃO E O IMPACTO HUMANO

Apesar de as raias de água doce da família Potamotrygonidae estarem presentes na maior parte dos principais sistemas fluviais da América do Sul, o manejo pesqueiro e a conservação destes animais ainda é um assunto precário (ZAIDEN et al., 2010).

A pesca e comercialização de raias de água doce é autorizada pelas portarias do IBAMA nº 36 de 25 de junho de 2003 e nº 27 de 31 de agosto de 2005, complementadas pela Instrução Normativa do IBAMA nº 204 de 22 de outubro de 2008, que lista seis espécies do gênero *Potamotrygon* que são permitidas de serem exportadas como peixe ornamental no Brasil. Essas regulamentações definem limites de captura por um sistema de cota anual para retirada de exemplares da natureza, mas há falta de registros oficiais sobre a pesca e captura destes animais (ZAIDEN et al., 2010).

Essa questão é ainda mais preocupante considerando os aspectos anteriormente discutidos relativos à dificuldade da classificação taxonômica. Rincon Filho (2006) declarou que o manejo pesqueiro baseado em quotas específicas de exportação pode não estar sendo uma medida de manejo adequada devido a problemas de identificação e aponta o risco de depleção de um estoque populacional antes mesmo dele ser identificado.

Reynolds et al. (2017) citaram que em 2013 foi elaborada proposta para adicionar algumas espécies de potamotrigonídeos à lista de animais ameaçados da CITES (Convention on International Trade in Endangered Species), mas todas as propostas foram negadas por dados insuficiente a respeito da população.

Para fazer o planejamento e manejo de conservação de uma espécie, é preciso saber que áreas esse animal habita, informações sobre forrageamento, como interage com outras espécies, dentre outros aspectos da sua biologia. No Brasil, o estudo sobre comportamento de peixes em habitat natural ainda é muito recente e a maior parte dos trabalhos deste tema refere-se a teleósteos, tendo ainda pouca informação a respeito dos elasmobrânquios e principalmente sobre raias da família Potamotrygonidae (GARRONE NETO; UIEDA, 2012).

Os potamotrygonídeos possuem o hábito de se enterrar, além de viverem em ambientes aquáticos com elevada turbidez. Garrone Neto e Uieda (2012) afirmaram que somente por observação visual é impossível obter dados em determinadas épocas do ano. Eles tiveram dificuldade de visualização dos animais principalmente nos meses de chuva (dezembro a março) e sugerem o uso de biotelemetria ou outras tecnologias similares para este tipo de estudo.

A atividade de pesca relativa a estes animais abrange uso local e internacional com finalidade de abastecer o mercado pet e de exibição de animais, mas também o consumo alimentar pela população local. Muitos animais são capturados e manejados de maneira inadequada. É difícil estimar a quantidade de animais que acaba morrendo, mas Duncan et al. (2016) relataram que muitos indivíduos eram descartados por apresentarem mutilações e lacerações decorrentes do transporte inadequado e que entre 1998 e 2004, 20% da população de *P. wallacei* capturada na natureza apresentava mutilações.

Além da pesca, há outras ameaças que deixam essas espécies em uma situação muito vulnerável. De Moraes et al. (2016) estudaram Potamotrygonídeos do rio Paraná em uma região que sofre impacto da agricultura, com pesticidas e outros nutrientes. A avaliação necroscópica dos animais mostrou alterações sugestivas de estresse ambiental, alta demanda do sistema imunológico, desordens metabólicas e nutricionais e intoxicação por poluentes.

Penfolds e Wyffels (2019) destacam o risco por conta do aquecimento global porque os hormônios esteroides na reprodução dos elasmobrânquios sofrem grande influência de pistas ambientais, especialmente da temperatura. Eles também lembram que outro problema para animais aquáticos é a acidificação do meio aquático por entrada do CO₂ atmosférico na água, que causa diminuição do pH.

Os elasmobrânquios possuem crescimento em pulsos, relacionados com os períodos de seca e em virtude da maior disponibilidade de alimentos. De forma geral

eles possuem crescimento lento, maturação sexual tardia e baixo potencial reprodutivo (DUNCAN et al., 2016; PENFOLD; WYFFELS, 2019). Além disso, apresentam baixa fecundidade uterina e vida reprodutiva curta, o que dificulta a recuperação da população de eventuais oscilações da mortalidade populacional, acarretando em maior tempo de recuperação, vulnerabilidade e muito baixa resiliência à pesca (RINCON FILHO, 2006).

Raias e tubarões possuem reprodução e ecologia muito diversos, então ainda falta conhecimento básico sobre reprodução e fisiologia de várias espécies. Pouco se sabe a respeito do papel dos elasmobrânquios no seu ambiente natural e do impacto da remoção de mesopredadores como as raias, tornando ainda mais inquestionável a necessidade de programas de reprodução em cativeiro para preservar as espécies vulneráveis (MORALES-GAMBA et al., 2019; PENFOLD; WYFFELS, 2019).

Uma problemática importante levantada por Goes de Araújo (2009) é a degradação ambiental e modificação do sistema natural, causadas pelo desenvolvimento residencial, comercial e industrial. Os autores caracterizaram essa degradação e modificação ambiental especificamente pela criação de portos ao longo do rio, barragens e represamento do Rio Paraná para navegação e construção de usinas hidrelétricas.

A questão relativa à construção da Usina Hidrelétrica de Itaipú é uma das mais comentadas em trabalhos científicos devido ao grande impacto que ela tem causado na distribuição geográfica das raias no rio Paraná. A região das Sete-Quedas era uma importante barreira geográfica que separava a fauna do alto Paraná da região mais baixa e com o fim do enchimento do reservatório da usina em 1982, ela foi submersa, possibilitando a livre movimentação de determinadas espécies. Garrone Neto e Haddad Júnior (2010) declararam que a invasão de raias no alto Paraná é “o primeiro caso conhecido de colonização envolvendo espécies de elasmobrânquios em todo o mundo”. Eles comentaram que os animais também estão se aproveitando dos canais artificiais e das eclusas instaladas nas barragens para o funcionamento da Hidrovia Tietê-Paraná para ampliar sua área de distribuição.

Outra questão que tem interferido na distribuição geográfica das raias nos rios é a atividade de fiscalização do comércio de peixes ornamentais, que apreende animais comercializados ilegalmente e realiza a soltura dos indivíduos em locais diferentes de onde foram capturados (DUNCAN et al., 2016). Além disso, a variedade de presas e alimentação dos potamotrygonídeos favorece a sobrevivência e o

sucesso de colonização de novas áreas e habitats por esses animais (GARRONE NETO; UIEDA, 2012).

Essa modificação da distribuição tem extrema relevância por conta dos impactos gerados sobre a população ribeirinha e turistas. Garrone Neto e Haddad Júnior (2010) fizeram um levantamento de relatos de acidentes por ferroadas de raias em banhistas e pescadores na Bacia do Alto Paraná. Eles se depararam com médicos e enfermeiros que não sabiam da ocorrência desses animais na bacia e desconheciam sobre a presença de toxinas nesses animais. Apesar de existirem relatos de vítimas desses acidentes, não existe registro oficial desse tipo de eventualidade, o que dificulta a tomada de medidas públicas em relação à conscientização da população e do preparo das equipes de saúde para atenderem esse tipo de ocorrência.

O ferrão das raias Myliobatiformes é retrosserrilhado e envolto por tecido repleto de glândulas secretoras de muco venenoso, gerando lesão mecânica e química no local ferroadado, que necessita de intervenção médica específica. Apesar disso, a ferroadada é resultante de um movimento reflexo da cauda desses animais quando algo toca sua região dorsal. As raias são incapazes de controlar esse mecanismo ativamente, sendo considerado um aparato utilizado apenas para fins de defesa (ROSA, 1985).

2.3 FISILOGIA

A teoria mais aceita é de que os *Potamotrygon* tenham se originado de elasmobrânquios marinhos que migraram para ambientes de água doce. Apesar de terem alguns aspectos parecidos com as raias marinhas, quando se trata de fisiologia os *Potamotrygonídeos* são considerados um grupo muito peculiar de elasmobrânquios. Eles sofreram algumas adaptações anatômicas e bioquímicas associadas à sobrevivência na água doce, como por exemplo a viviparidade, a capacidade dos espermatozoides de serem ativados em água doce e modificações do sistema eletrossensorial para funcionar em um ambiente de baixa condutividade (BALLANTYNE; ROBINSON, 2010).

Como a condutividade da água doce é muito menor que na água salgada, o sentido da eletrocepção não é tão utilizado pelas raias de água doce. As Ampulas de Lorenzini (órgãos sensoriais envolvidos na eletrocepção) são pouco desenvolvidas

nessas espécies sendo chamadas de “microampolas” (ROSA, 1985; BALLANTYNE; ROBINSON, 2010).

Em relação ao controle de NaCl, um órgão muito importante para os elasmobrânquios marinhos é a glândula retal, que tem menor tamanho e não é funcional nos *Potamotrygon* (ROSA, 1985; BALLANTYNE; ROBINSON, 2010). As brânquias são responsáveis pela captação de íons como o sódio, sendo muito importantes na regulação ácido-base e com função fundamental para espécies que vivem em habitats ácidos como as águas escuras do ambiente amazônico (BALLANTYNE; ROBINSON, 2010).

A característica evolutiva mais marcante do grupo foi o fato de que conseguiram eliminar completamente a necessidade da ureia em seu metabolismo. Os compostos nitrogenados como a ureia são osmólitos muito importantes para elasmobrânquios marinhos, mas em ambientes diluídos como a água doce, ela deve ser reduzida (BALLANTYNE; ROBINSON, 2010). Enquanto os rins nas espécies marinhas é bem estruturado para retenção de ureia, os *Potamotrygon* perderam as estruturas renais para retenção desse metabólito, o que torna impossível o retorno dessas espécies para a água salgada (THORSON, 1970; ROSA, 1985).

Uma característica hormonal interessante desses animais é que o eixo hipotálamo-pituitária-interrenal depende de apenas um corticoide, a 1α -hydroxycorticosterona (AHC). Os elasmobrânquios não possuem cortisol e as funções desse hormônio são atribuídas totalmente à AHC, que acredita-se que tenha função tanto de glicocorticoide quanto de mineralocorticoide (BALLANTYNE; ROBINSON, 2010).

2.4 CICLO REPRODUTIVO

Quando se pesquisa sobre reprodução de peixes cartilaginosos como as raias, a maior parte dos trabalhos são relativos a espécies marinhas. Para esses animais a reprodução é geralmente classificada como: não sazonal em espécies não migratórias de águas profundas, pelágicas e tropicais (como a *Himantura signifer* estudada por Chatchavalvanich, Thongpan e Nakai [2004]), provavelmente por conta da temperatura da água se manter relativamente constante; parcialmente sazonal em algumas espécies ovíparas; e sazonal em regiões costeiras subtropicais, onde pode-se observar os animais formando grandes agregados que migram de forma sazonal,

possivelmente devido à temperatura e disponibilidade de alimentos (PENFOLD; WYFFELS, 2019). Ainda assim, os elasmobrânquios possuem grande plasticidade reprodutiva e (PENFOLD; WYFFELS, 2019) citam alguns trabalhos com tubarões, mostrando que mesmo populações de uma mesma espécie podem apresentar modificações na reprodução por interferência da localização geográfica.

Entretanto, quando estudamos as raias de água doce da América do Sul, é preciso mais atenção e cautela ao tentar definir um padrão para os ciclos biológicos. Sabe-se que esses animais possuem longos períodos de gestação e ciclos reprodutivos complexos, mas a dificuldade em se obter coletas periódicas de animais contribui para a falta de estudos sistemáticos sobre sua reprodução. Isso torna impossível o desenho esquemático de todas as etapas envolvidas, como a maturidade, cópula, fecundação, gestação, parto e estimativa da periodicidade (RINCON FILHO, 2006).

Charvet-Almeida, De Araújo e De Almeida (2005) avaliaram macroscopicamente os órgãos sexuais das espécies *Plesiotrygon iwamae*, *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi*, *P. schroederi*, e *Potamotrygon sp.* e verificaram que elas possuem o ciclo reprodutivo diretamente relacionado com o ciclo hidrológico das bacias hidrográficas onde vivem. Por estudarem animais que habitam rios Amazônicos, eles supuseram que ao longo da evolução as raias de água doce precisaram adaptar seus ciclos de vida em relação aos ciclos hidrológicos desses locais, que geralmente são períodos bem definidos. Uma observação relevante feita pelos autores foi de que todas as espécies estudadas apresentaram um período de descanso reprodutivo em seus ciclos.

Charvet-Almeida, De Araújo e De Almeida (2005) também apresentaram uma particularidade crítica a trabalhos que definem os períodos reprodutivos em meses ou estações climáticas sem considerar possíveis alterações dos ciclos hidrológicos durante o período de estudo. Eles também citaram trabalhos que apresentam diferentes hipóteses para explicar os motivos da relação entre o ciclo reprodutivo das raias e os ciclos hidrológicos, tais como alterações na salinidade, mudanças de temperatura e mudanças físico-químicas na água provocadas pelas chuvas.

2.5 BIOLOGIA REPRODUTIVA DA FÊMEA

Os elasmobrânquios podem ser ovíparos ou vivíparos e dentre os vivíparos, podem nutrir os fetos de forma placentária ou aplacentária. As raias Myliobatiformes apresentam um modo de reprodução identificado como viviparidade aplacentária com trofonemata (HAMLETT & KOOB, 1999 apud RINCON FILHO, 2006). Isso significa que os embriões ficam retidos no útero durante todo o período de desenvolvimento e nascem como cópias em miniatura dos adultos. Além disso, sua nutrição é garantida por análogos da placenta chamados “trofonemata”, que são regiões do epitélio uterino com longas vilosidades. Essas estruturas produzem uma secreção nutritiva chamada de “leite uterino” ou “embriotrofo” e os embriões se alimentam dessa substância (CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004).

Não se sabe exatamente o porquê dessa estratégia reprodutiva, mas existe uma teoria partindo do princípio de que a casca dos ovos dos elasmobrânquios marinhos é muito permeável à água e ureia. Supondo que as primeiras raias que tenham migrado para a água doce precisassem ainda reter ureia como as marinhas, o influxo de água dispenderia um alto gasto energético do embrião, então ficar protegido dentro do útero da mãe seria uma forma mais vantajosa do ponto de vista osmótico e energético (BALLANTYNE; ROBINSON, 2010).

Com nascimento de filhotes relativamente grandes e em pequeno número, os elasmobrânquios são reprodutivamente mais semelhantes aos répteis, mamíferos e aves do que a outros peixes (PENFOLD; WYFFELS, 2019). O tempo de gestação, número de filhotes e momento do parto variam de acordo com a espécie, mas de forma geral, as raias do gênero *Potamotrygon* apresentam período gestacional longo e baixa fecundidade uterina, com poucos filhotes por parto (CHARVET-ALMEIDA; DE ARAÚJO; DE ALMEIDA, 2005; RINCON FILHO, 2006).

O sistema reprodutivo da fêmea possui estruturas especializadas no armazenamento de espermatozoides, sendo esta uma estratégia reprodutiva comum e documentada em diversas espécies de peixes cartilagosos (WOURMS, 1977; PENFOLD; WYFFELS, 2019). Carrier, Pratt Jr. e Castro (2004) citaram alguns autores relatando o tempo de produção de embriões férteis com número de dias variando entre 28 até surpreendentes 843 dias pós cópula.

Algumas espécies de elasmobrânquios são poliândricas e apresentam múltipla paternidade, porém, Penfold e Wyffels (2019) relataram que a maioria das espécies

mostraram baixa eficácia de maximização da paternidade, e que mais estudos sobre qualidade e competição espermática são necessários. Lyons et al. (2017) alegaram que existem poucos estudos sobre múltipla paternidade em elasmobrânquios e ainda julga os poucos trabalhos em relação a isso porque foram realizados em ambiente de cativeiro. De acordo com os autores, essa condição altera as oportunidades de cópula, resultando na subestimação da múltipla paternidade e do sucesso reprodutivo dos machos pelo número limitado de indivíduos reprodutivamente ativos no ambiente.

Lyons et al. (2017) estudaram uma espécie de raia marinha que apresenta múltiplas cópulas e acreditam que as fêmeas ovulam seus ovos periodicamente, com o acasalamento ocorrendo ao longo desse processo, ao invés de ovularem todos os seus ovos de uma vez para então prosseguir para o acasalamento. Os pesquisadores também encontraram grande variabilidade na massa testicular entre os machos, sugerindo a existência de forte competição espermática.

2.6 ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTIVO MASCULINO

A maturidade para os machos é determinada por um ou mais dos seguintes fatores: largura do disco, grau de calcificação dos cláspers, enrolamento dos canais deferentes ou epidídimos e presença de sêmen nas ampolas ou vesículas seminais". (PENFOLD; WYFFELS, 2019)

Os machos atingem a maturidade sexual com tamanho menor que a fêmea, que precisam de maior espaço na cavidade abdominal para acomodar os embriões. Essa medida varia conforme a espécie e pode haver diferenças entre indivíduos de vida livre e mantidos em cativeiro e populações que vivem em áreas geográficas diferentes (CHARVET-ALMEIDA; DE ARAÚJO; DE ALMEIDA, 2005).

A calcificação dos cláspers pode ser classificada em não calcificado, parcialmente calcificado e calcificado (PEDREROS-SIERRA; RAMÍREZ-PINILLA, 2015). O macho imaturo é facilmente identificado por não possuir essas estruturas totalmente calcificadas (RINCON FILHO, 2006). Já para saber o estágio de maturidade sexual de um macho maduro é preciso avaliar os testículos, que são intracavitários. Essa avaliação pode ser feita visualmente durante a necropsia ou também em um animal vivo com uso de equipamento de ultrassonografia (RINCON FILHO, 2006).

Pedreros-Sierra e Ramírez-Pinilla (2015) estudaram o sistema reprodutivo de machos de *Potamotrygon*, correlacionando análise microscópica com características macroscópicas. Dessa forma eles definiram 4 estágios de maturidade sexual para o gênero: imaturo, em maturação, reprodutivamente ativo e em descanso reprodutivo. Os autores relataram o encontro de machos férteis durante todos os períodos do experimento, mas alguns indivíduos em fase de descanso reprodutivo, caracterizado macroscopicamente pela mudança da aparência dos testículos e microscopicamente pela cessação na produção de células e secreções germinais e pela estrutura dos tecidos. Isso mostra que os machos podem continuar reproduzindo o ano todo, mas alguns indivíduos podem ter um pequeno período de regressão gonadal.

Quando sexualmente maduros, os machos possuem sistema reprodutivo composto por um par de testículos, órgão epigonal, ductos eferentes, epidídimos (divididos em cabeça, corpo e cauda), glândula de Leydig, ductos deferentes que distalmente se diferenciam formando a vesícula seminal, papila urogenital, glândulas alcalinas de Marshall, sacos sinfônicos, um par de cláspes e glândulas do cláspes (CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004; CHATCHAVALVANICH; THONGPAN; NAKAI, 2004; RINCON FILHO, 2006; PEDREROS-SIERRA; RAMÍREZ-PINILLA, 2015). A Figura 1 traz um desenho esquemático do sistema reprodutor masculino, mas sem escala representativa dos órgãos. Pedreros-Sierra e Ramírez-Pinilla (2015) descrevem em detalhes esses órgãos em cada fase de maturação, apresentando imagens da morfologia macro e microscópica.

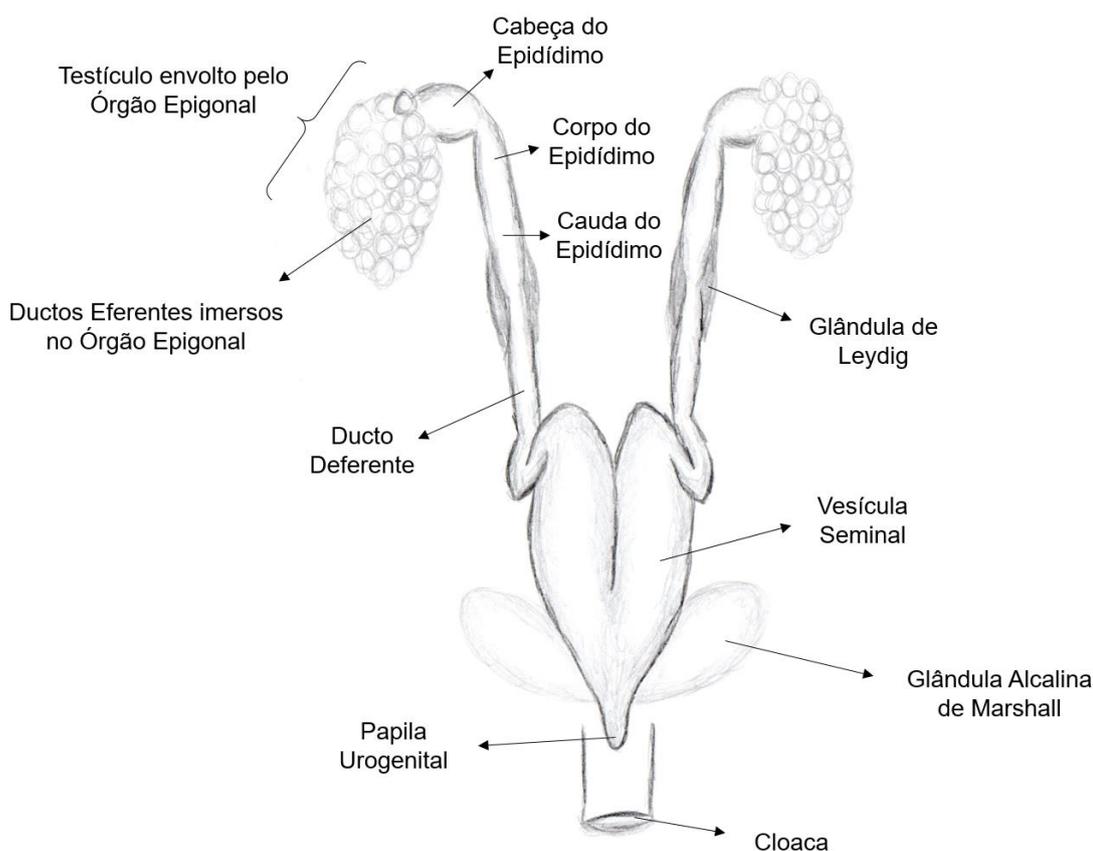
Os testículos da raia de água doce são órgãos pareados e alongados, localizados na cavidade peritoneal, onde estão suspensos da parede dorsal pela mesorquia. O testículo esquerdo é significativamente mais pesado do que o testículo direito (CHATCHAVALVANICH; THONGPAN; NAKAI, 2004).

Algumas peculiaridades da estrutura testicular dos peixes cartilaginosos são espermatogênese cística, com testículos formados por unidades funcionais lobulares chamadas espermatocistos, arranjados de forma zonal, e a associação dos testículos com o órgão epigonal (CHATCHAVALVANICH; THONGPAN; NAKAI, 2004; PEDREROS-SIERRA; RAMÍREZ-PINILLA, 2015).

O órgão epigonal possui função linfomieloide e hematopoiética, mas ainda assim, nos elasmobrânquios ele é considerado parte do sistema reprodutivo por ser intimamente ligado aos testículos. Essa ligação é tão marcante que parecem ser um órgão só, apesar de diferirem na consistência e coloração. Essa dupla de órgãos fica

na região anterodorsal da cavidade peritoneal e são formados por lobos. Dentre as diferentes fases reprodutivas, a alteração testicular mais evidente é o grau de desenvolvimento e lobulação, sendo que nas fases de atividade reprodutiva o órgão epigonal fica involuído e os testículos parecem um cacho de uvas (PEDREROS-SIERRA; RAMÍREZ-PINILLA, 2015).

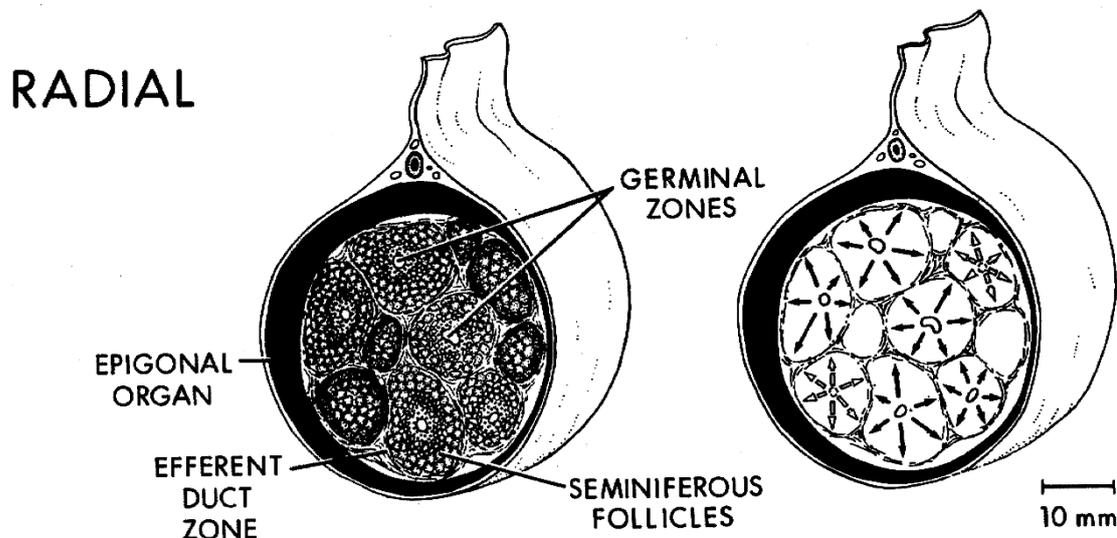
Figura 1 - Desenho esquemático do sistema reprodutor masculino de raias do gênero *Potamotrygon*



Fonte: RAMOS (2021), baseado em RINCON FILHO (2006), PEDREROS-SIERRA e RAMÍREZ-PINILLA (2015) e SEBBEN et al. (2019).

Microscopicamente, Pratt Jr. (1988) dividiu a estrutura testicular de elasmobrânquios nos tipos diamétrica, radial e composta e classificou os Patomotrygonídeos no tipo radial (Figura 2). No testículo com essa estrutura, a zona germinativa está no centro do lóbulo e o desenvolvimento dos folículos seminíferos prossegue radialmente a partir do centro em direção à circunferência, onde os ductos eferentes coletam os espermatozoides à medida que amadurecem (CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004). Uma boa descrição histológica desse órgão pode ser vista no estudo de Zaiden et al. (2010).

Figura 2 - Desenho esquemático do desenvolvimento dos folículos seminíferos no testículo de estrutura radial



Fonte: PRATT JR. (1988)

Pratt Jr. (1988) sugere que uma vantagem da estrutura radial é que o percurso que o espermatozoide percorre para chegar ao epidídimo se mantém relativamente constante, mesmo que o macho fique maduro e o volume testicular aumente. Isso difere do testículo com estrutura diamétrica, no qual essa distância aumenta quando o testículo aumenta de tamanho, além de ser vantajoso para as raias, que possuem a estrutura corporal compacta e menor volume cavitário.

Chatchavalvanich, Thongpan e Nakai (2004) e Carrier, Pratt Jr. e Castro (2004) explicam que o testículo é dividido nas zonas germinativa, espermatogonial, espermatocisto, espermatíte, espermatozoal e degenerativa. O ducto intratesticular é visto nas duas primeiras e depois as espermatogônias ligadas às células de Sertoli vão se multiplicando até que o lúmen do espermatocisto desaparece. As espermatogônias viram espermatídes e várias espermatídes associadas à célula de Sertoli são chamadas de espermatoblasto. Os espermatocistos se desenvolvem e crescem até romperes, liberando os espermatozoides no ducto intratesticular. Na zona degenerativa, o espermatocisto diminui de tamanho enquanto sofre degeneração e reabsorção, então é possível visualizar novamente os ductos, que nessa região são mais desenvolvidos. Depois eles se ligam aos vasos eferentes, que desembocam no epidídimo e assim por diante. Os autores relataram que esta observação sobre o sistema de dutos da raia de água doce confirma que o sistema de dutos genitais em

peixes cartilagosos é mais semelhante ao dos vertebrados superiores do que ao dos teleósteos.

Penfold e Wiffels (2019) explicam que existem vários termos usados para descrever a anatomia reprodutiva do trato reprodutivo elasmobrânquico e que o epidídimo também é conhecido como ductos extra-testiculares, que é contínuo com o ducto deferente, também descrito como canal deferente.

A glândula de Leydig fica ligada ao início do epidídimo e libera fluido tanto para o epidídimo quanto para o ducto deferente (CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004; PENFOLD; WYFFELS, 2019). Ela possui células especializadas em produção de proteínas que facilitam a maturação dos espermatozoides, contribuem para a formação do fluido seminal e para a formação de aglomerados de espermatozoides (CHATCHAVALVANICH; THONGPAN; NAKAI, 2004; PEDREROS-SIERRA; RAMÍREZ-PINILLA, 2015).

O ducto deferente continua até as vesículas seminais, também descritas como ampolas (PENFOLD; WYFFELS, 2019). Esse órgão apresenta mudanças estruturais entre os estágios reprodutivos (ativo e em repouso), possui epitélio secretor com projeções do citoplasma para o lúmen e presença de dobras grande e delgadas, que aumentam a área de superfície provavelmente para troca de nutrientes (PEDREROS-SIERRA; RAMÍREZ-PINILLA, 2015). A grande quantidade de células espermáticas no lúmen da vesícula seminal mostra que elas ficam estocadas lá antes da cópula e ejaculação e esse processo é diferente dos teleósteos, nos quais o esperma fica armazenado nos ductos deferentes (CHATCHAVALVANICH; THONGPAN; NAKAI, 2004). Durante o período de descanso reprodutivo, a vesícula seminal possui certa quantidade de espermatozoides, mas no período ativo essa quantidade é muito maior e com presença de secreções, fazendo com que o lúmen fique muito mais expandido (PEDREROS-SIERRA; RAMÍREZ-PINILLA, 2015).

As Glândulas Alcalinas de Marshall ficam localizadas próximas à vesícula seminal e produzem uma secreção fluida de coloração branca, altamente alcalina e que parece estar envolvida na formação de plug copulatório (HAMLETT, 1999, apud CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004). Essa glândula pode estar vazia ou cheia e aparentemente não se modifica com o grau de maturação do indivíduo (PEDREROS-SIERRA; RAMÍREZ-PINILLA, 2015). Dzyuba et al. (2019) comentaram que as Glândulas Alcalinas parecem ser específicas para raias e não para tubarões. Os

autores mostraram que o fluido dela altera alguns parâmetros de motilidade dos espermatozoides, mas a função dessa glândula ainda não está muito clara.

A porção final das vesículas seminais compartilham o mesmo lúmen dos ureteres e emparelhadas, se unem formando um único seio urogenital que se abre para a cloaca por meio de uma projeção cônica chamada papila urogenital (CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004; CHATCHAVALVANICH; THONGPAN; NAKAI, 2004; PENFOLD; WYFFELS, 2019).

Todos os segmentos do ducto genital masculino possuem cílios e não possuem túnica muscular, sugerindo que o sistema de dutos transporte o esperma através de atividade ciliar. Essa característica difere dos mamíferos, que geralmente transportam os espermatozoides por meio de contrações do músculo liso (CHATCHAVALVANICH; THONGPAN; NAKAI, 2004).

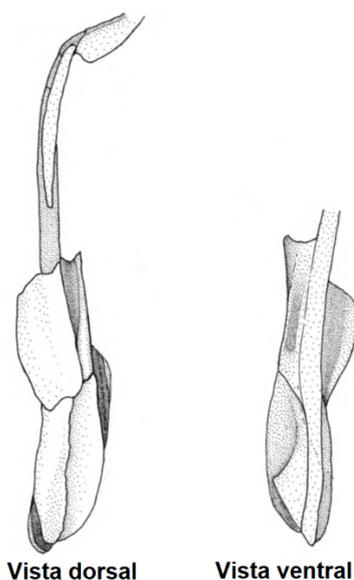
Todos os elasmobrânquios possuem fertilização interna (BALLANTYNE; ROBINSON, 2010; ANAYA-LÓPEZ; RAMÍREZ-PINILLA, 2017; PENFOLD; WYFFELS, 2019), o que melhora a probabilidade e a eficiência da fertilização e evita o desperdício de esperma. Para isso, esses peixes desenvolveram os cláspes, que são órgãos sexuais secundários intromitentes, presentes apenas nos machos. Eles estão presentes em par, cada um de um lado da cauda e são uma modificação da borda mediana posterior da nadadeira pélvica, que se alonga em forma de tubo não completamente fundido (CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004).

Colbachini et al. (2018) fizeram uma breve revisão a respeito das funções e movimentos dos cláspes e citam diversos trabalhos relatando movimentos desses órgãos em contextos reprodutivos. Além disso, relataram alguns movimentos relacionados a comportamentos agonísticos e em seu estudo, sugerem que o movimento do cláspes tenha relação com hormônios sexuais presentes na água.

Os cláspes possuem esqueleto composto por uma série de cartilagens e existem diversos trabalhos que as descrevem em detalhes (Figura 3) (MCEACHRAN; ASCHLIMAN, 2004; SILVA; CARVALHO, 2011; DE MOREIRA; LOBODA; DE CARVALHO, 2018). De Moreira, Loboda e De Carvalho (2018) explicam que a maioria dos trabalhos descrevendo cláspes são relativos à descrição de novas espécies, mas não exatamente um estudo comparativo entre gêneros. Os autores avaliaram os cláspes de oito das 30 espécies válidas de *Potamotrygon* e constaram que elas não apresentam variações anatômicas consideráveis. Eles relatam que encontraram diferenças entre os gêneros *Paratrygon*, *Heliotrygon* e *Plesiotrygon*, apesar de

Taniuchi e Ishihara (1990) não observaram diferenças significativas na estrutura anatômica dos gêneros *Paratrygon*, *Potamotrygon* e *Dasyatis*.

Figura 3 - Cartilagens do cláster de um potamotrygonídeo



Fonte: MCEACHRAN; ASCHLIMAN (2004)

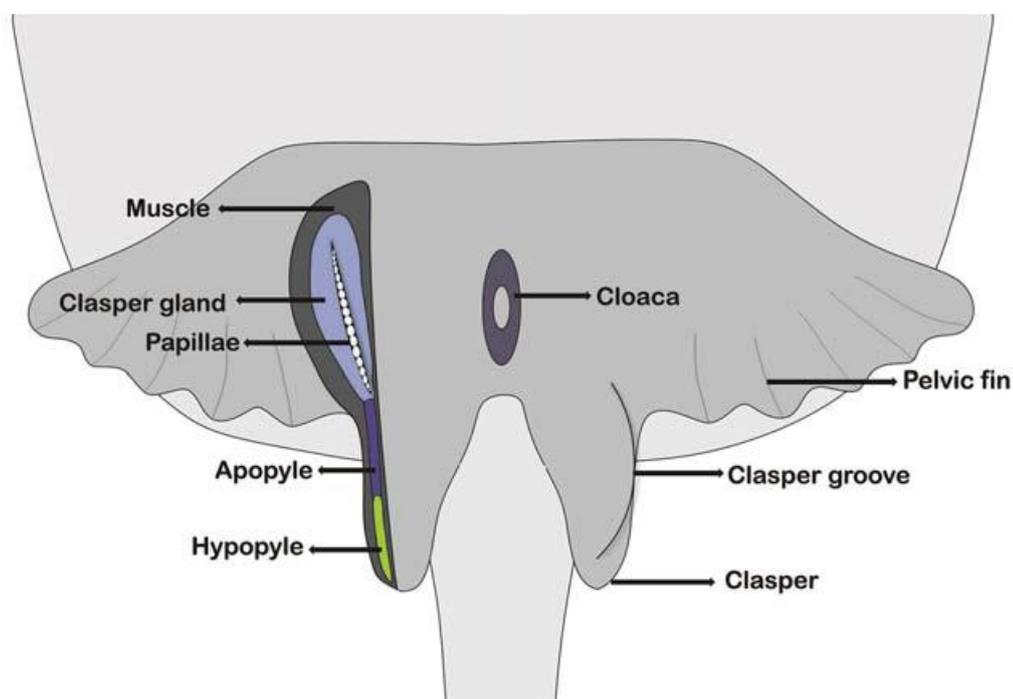
Em jovens imaturos os clásteres são pequenos e flexíveis e conforme o animal vai se desenvolvendo sexualmente, eles vão ficando calcificados, rígidos e formam articulações com a base da nadadeira pélvica (CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004). Pedreros-Sierra e Ramírez-Pinilla (2015) observaram que a completa calcificação dos clásteres só ocorre após o total desenvolvimento dos órgãos reprodutivos internos e por isso esse parâmetro é um bom indicativo para a maturidade sexual em machos. Além da calcificação, outra característica dos clásteres que determina maturidade sexual é a habilidade de abrir e espalhar a estrutura chamada “ripídio” e enrijecer outra estrutura chamada “esporão” (CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004).

O tubo do cláster vai da sua abertura proximal, chamada apópila até a abertura distal, chamada hipópila (Figura 4). Durante a cópula os clásteres são rotacionados para frente e o macho insere um ou ambos os clásteres na fêmea. Dentro da fêmea, a expansão do ripídio e o esporão auxiliam na fixação do macho na fêmea (CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004).

Apesar de a apópila não possui ligação com a papila urogenital, que é o local da liberação de espermatozoides dentro da abertura cloacal, parece que ao girar o

clásper para frente durante o acasalamento, forma-se uma conexão entre o apópilo do clásper e a papila urogenital. No apópilo também há conexão com os pseudo-sifões, que são um par de sacos musculares localizados abaixo da pele na porção ventral do corpo e se estendem anteriormente até próximo das nadadeiras peitorais. Alguns autores especulam que os sacos do sifão seriam responsáveis por um fluxo de água que levaria os espermatozoides através do tubo do clásper até o sistema reprodutivo feminino. Também há especulação de que podem servir para liberar o trato reprodutivo feminino do sêmen de acasalamentos anteriores (MINAMIKAWA; MORISAWA, 1996; CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004; MCEACHRAN; ASCHLIMAN, 2004).

Figura 4 - Desenho esquemático da região pélvica de um macho maduro



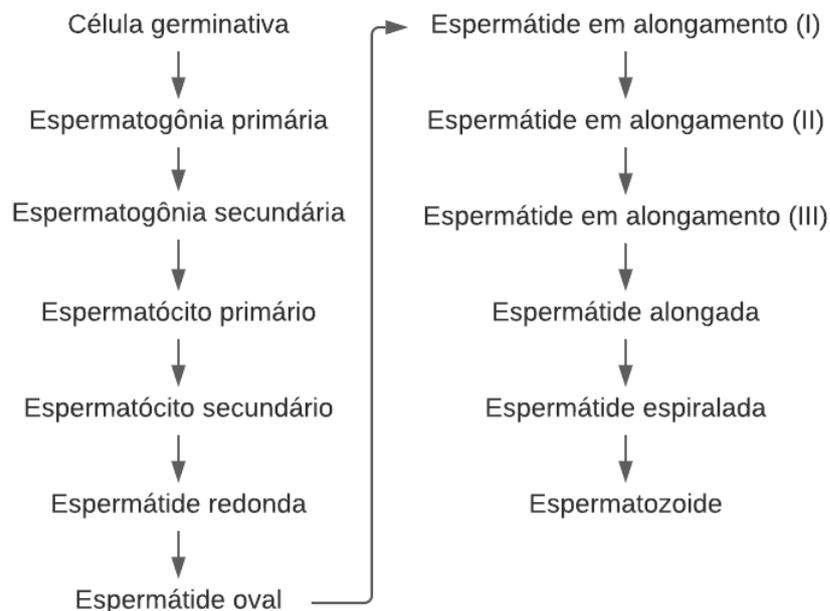
Fonte: ANAYA-LÓPEZ; RAMÍREZ-PINILLA (2017)

Em sua porção anterior, os cláspes se comunicam com as glândulas do clásper, que são envolvidas por um saco muscular e secretam uma substância branca e viscosa composta por glicoproteínas e mucopolissacarídeos sulfatados que se misturam ao sêmen. (ANAYA-LÓPEZ; RAMÍREZ-PINILLA, 2017) citam alguns trabalhos sobre essa glândula em raias marinhas, mas assumem que a composição da secreção nos *Potamotrygon* é diferente e que a função do conteúdo da glândula do clásper neste gênero ainda está só na teoria.

2.7 ESPERMATOZOIDES

Os hormônios esteroides são os responsáveis pelo controle do processo de espermatogênese (MORALES-GAMBA et al., 2019). (Chatchavalvanich, Thongpan e Nakai (2005) e Zaiden et al. (2010) descrevem a microscopia do espermatozoide nas diferentes etapas desse processo e Zaiden et al. (2010) ainda categorizaram as células espermáticas em 13 tipos diferentes (Figura 5).

Figura 5 - Diagrama esquemático da espermatogênese em *Potamotrygon*



Fonte: RAMOS (2021) baseado em ZAIDEN et al. (2010)

A estrutura básica do espermatozoide dos peixes cartilagosos é composta por uma cabeça terminando em um pequeno acrossomo, uma peça intermediária coberta por uma manga citoplasmática e flagelo. A cabeça de formato helicoidal, espiralada em seu próprio eixo, difere em comprimento e número de giros entre as espécies e não está relacionada ao tamanho da espécie (Figura 6) (TANAKA; KUROKAWA; HARA, 1995; PENFOLD; WYFFELS, 2019).

A vesícula acrossomal e a cauda dos espermatozoides começam a se formar na fase das espermatídes (CHATCHAVALVANICH; THONGPAN; NAKAI, 2004). O acrossomo tem um recorte posterior profundo que se encaixa sobre a porção anterior do núcleo, que tem forma pontiaguda. Eles são cobertos pela membrana plasmática

do espermatozoide com pouco espaço intermediário e ambos possuem configuração helicoidal (STANLEY, 1971).

Figura 6 - Espermatozoide de *Potamotrygon* (aumento de 1.000x)



Fonte: RAMOS (2021)

O processo de espiralamento ocorre na fase final da espermatogênese, iniciando a partir da cromatina e do núcleo, na porção posterior seguindo em direção à região anterior (STANLEY, 1971; ZAIDEN et al., 2010). O desenvolvimento dessa forma estrutural ocorre devido à condensação de fibras de nucleoproteínas (CHATCHAVALVANICH; THONGPAN; NAKAI, 2004, 2005).

Chatchavalvanich, Thongpan e Nakai (2005) dizem que a forma torcida da cabeça do espermatozoide é um aspecto distinto das raias, similar a outros condrictes e também aos passeriformes. Eles consideram que essa característica em comum não é surpreendente porque esses animais têm espermatozoides de forma muito alongada em comparação com outros vertebrados.

Outra peculiaridade interessante dos espermatozoides de peixes cartilagosos é que eles formam agregados como massas arredondadas, ovoides ou tubulares, nos quais as células ficam organizadas de forma radial. Esses arranjos possuem muita variação e pouco se sabe sobre sua função ou nomenclatura correta (CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004; PEDREROS-SIERRA; RAMÍREZ-PINILLA, 2015).

Tanaka, Kurokawa e Hara (1995) avaliaram o fluido seminal de diversas partes do sistema reprodutivo logo após a morte do animal e identificaram 5 tipos diferentes de agregação das células espermáticas: espermatozoide solitário ou agregado de espermatozoides, camada única de espermatozeugmata, espermatozeugmata composto, espermatóforo tipo grão de arroz e espermatóforo com forma atípica de bastão.

De forma geral, esses pacotes de espermatozoides são classificados em dois tipos: espermatóforos, que são espermatozoides completamente envoltos e encapsulados em uma matriz de forma ovoide (PRATT; TANAKA, 1994; PENFOLD; WYFFELS, 2019); e espermozeugmata, que são espermatozoides alinhados lateralmente e organizados radialmente com as cabeças embutidas em uma matriz de material secretório granular denso (provavelmente composta por grânulos secretados pela Glândula de Leydig), de forma redonda ou alongada, mas não encapsulados, com as caudas batendo livremente ao redor (CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004; PEDREROS-SIERRA; RAMÍREZ-PINILLA, 2015) (Figura 7).

Figura 7 - Espermatozeugmata e agregados de espermatozoides em *Potamotrygon* (aumento de 400x)



Fonte: RAMOS (2021)

Embora sejam mais comumente observados na vesícula seminal, Minamikawa e Morisawa (1996) notaram que os espermatozoides formavam aglomerados já no túbulo seminífero, mas eram separados pela diluição com plasma seminal do epidídimo. Penfold e Wyffels (2019) observaram agregados a partir do epidídimo e Pedreros-Sierra e Ramírez-Pinilla (2015) observaram a presença de espermatozeugmatas começando a se formar no ducto deferente de machos reprodutivamente ativos.

Pedreros-Sierra e Ramírez-Pinilla (2015) declararam que os espermatozeugmas ainda não foram descritos nos potamotrigonídeos, mas observaram sua presença em *P. magdalenae*. Embora nem todas as espécies de

elasmobrânquios apresentem esses aglomerados (CHATCHAVALVANICH; THONGPAN; NAKAI, 2004; MORALES-GAMBA et al., 2019), acredita-se que essas agregações podem servir como proteção aos espermatozoides da quebra ou perda na exposição à água durante a cópula, ou outras condições físicas ou químicas que possam comprometer a viabilidade dos espermatozoides (CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004).

A estrutura helicoidal dos espermatozoides dos elasmobrânquios faz com que essas células se movimentem a partir da rotação em torno do seu longo eixo, movimentando o flagelo em espiral e progredindo de forma semelhante a uma hélice (STANLEY, 1971; MINAMIKAWA; MORISAWA, 1996). Quanto à velocidade, os espermatozoides de *Potamotrygon* são mais lentos que a maioria dos mamíferos, aves e peixes, mas na mesma faixa de velocidade de anuros (DZYUBA et al., 2019).

Minamikawa e Morisawa (1996) observaram que alguns espermatozoides de tubarão se moviam para trás, mas só consideraram como móveis os que apresentaram movimento progressivo. Penfold e Wyffels (2019) citaram vários trabalhos relatando esse tipo de movimento em espécies de tubarão e declararam que a motilidade reversa pode ser vantajosa em elasmobrânquios. Eles assumem que se os espermatozoides forem armazenados no sistema reprodutivo da fêmea, essa movimentação favoreceria a reorientação dos espermatozoides para permitir um melhor movimento através do trato feminino.

Dzyuba et al. (2019) avaliaram a motilidade dos espermatozoides coletados em diferentes pontos ao longo do sistema reprodutor masculino e observaram que as células não possuem motilidade no testículo adquirindo essa capacidade após passarem pelo epidídimo. Por conta disso eles sugerem a existência de um processo de maturação dos espermatozoides no epidídimo dos potamotrygonídeos.

A motilidade espermática permanece relativamente estável em diferentes partes do sistema reprodutivo masculino, mas apresenta aumento de velocidade significativo após entrar em contato com fluido uterino (DZYUBA et al., 2019). Nos animais com fecundação interna, como os elasmobrânquios, os espermatozoides ficam armazenados dentro das vesículas seminais em estado móvel quiescente, possuindo apenas um potencial de movimento e adquirindo real motilidade após um estágio de capacitação espermática no trato reprodutivo feminino logo antes da fertilização (MINAMIKAWA; MORISAWA, 1996; DZYUBA et al., 2019).

A ativação do espermatozoide, resultando em células com movimento progressivo vigoroso, ocorre por alteração da concentração de diferentes eletrólitos. Essa mudança iônica ocorre naturalmente no trato reprodutivo feminino, ou artificialmente através de diluição em soluções laboratoriais (MINAMIKAWA; MORISAWA, 1996).

(Minamikawa e Morisawa (1996) examinaram os constituintes inorgânicos e orgânicos, a pressão osmótica e o pH no plasma seminal e no fluido do útero de tubarões e relataram que os efeitos desses componentes na motilidade dos espermatozoides variam de acordo com a espécie animal. Os autores observaram que os ambientes iônicos e a hexose têm papéis importantes na iniciação da motilidade espermática na ejaculação e na manutenção desta no trato reprodutivo feminino. Quando misturavam o sêmen com outros diluentes e colocavam de novo no fluido uterino, ele perdia motilidade, mas quando mantido só no fluido uterino a motilidade era mantida, confirmando que o fluido do útero tem capacidade de manutenção da motilidade do esperma. Os pesquisadores mencionaram que os espermatozoides no fluido do útero e no plasma sanguíneo mantiveram a motilidade no nível original por 12 horas, sugerindo que os espermatozoides mantenham uma longa vida útil no útero após a ejaculação.

Dzyuba et al. (2019) observaram que o ejaculado de *Potamotrygon magdalenae* é extremamente concentrado e compararam com outros trabalhos usando *P. motoro*, que mostraram dados semelhantes. Eles apresentaram duas teorias para a alta concentração espermática do ejaculado de animais desse gênero: 1) Como a cloaca não tem contato direto com os cláspes e acredita-se que os espermatozoides passem por ele para serem entregues à fêmea, esse aumento na produção de espermatozoides diminuiria o risco de perda de espermatozoides durante a cópula e poderia ser benéfico para o sucesso na fertilização; 2) A partir de trabalhos que relatam poliandria em peixes cartilaginosos, uma produção efetiva e eficiente de esperma pode estar associada à competição espermática.

Dzyuba et al. (2019) ainda fizeram outra observação interessante a respeito da concentração espermática e notaram que a concentração de espermatozoides era mais baixa em amostras de sêmen da cloaca, em comparação com as amostras de espermatozoide da vesícula seminal. Isso indica que durante a ejaculação o espermatozoide da vesícula seminal é diluído por uma mistura de fluido da vesícula seminal, fluido da glândula alcalina e/ou urina.

2.8 REPRODUÇÃO ASSISTIDA

No passado, a maioria dos dados relativos à reprodução foram coletados a partir da eutanásia de animais provindos da natureza. Hoje em dia, com grande parte das espécies de elasmobrânquios sendo definidas como ameaçadas, está ocorrendo uma mudança para uso de métodos não letais de coleta de dados para esses animais, especialmente para tecnologias reprodutivas, como ultrassom e análises hormonais (PENFOLD; WYFFELS, 2019).

Os aquários tem um papel importante no apoio às pesquisas com elasmobrânquios, principalmente no estudo da biologia reprodutiva básica. Em relação aos estudos com animais de vida livre, essas instituições possuem as vantagens da facilidade de manejo com os animais, posse de equipe treinada, possibilidade de acompanhamento a longo prazo e manutenção de espécies que podem servir de modelo para animais que ainda não são possíveis de serem mantidos em cativeiro (PENFOLD; WYFFELS, 2019).

Além disso, tecnologias como colheita de sêmen e inseminação artificial estão permitindo o manejo de populações pequenas ou restritas, com sêmen preservado a baixas temperaturas sendo enviado entre instituições para maximizar a variabilidade genética e manejo das populações (PENFOLD; WYFFELS, 2019).

A primeira etapa para a reprodução assistida é a contenção dos animais para colheita dos espermatozoides e os elasmobrânquios podem ser contidos segurando-os em decúbito dorsal. Nesta posição, o animal permanece relativamente relaxado para permitir a realização de exames e procedimentos menores, como por exemplo, ultrassom, coleta de sangue e cateterização do trato reprodutivo (DALY et al., 2007; DALY, 2008)

No caso das raias, que possuem um ferrão venenoso na cauda, pode ser necessária sedação ou anestesia para contenção e dessa forma reduz-se o risco de ferimentos no animal e nas pessoas envolvidas no manejo (DALY et al., 2007; DALY, 2008).

Reynolds et al. (2017) dão instruções sobre como fazer uma contenção segura das raias e explicam como deve ser o manuseio, quais cuidados devem ser tomados para contenção e cobertura do espinho venenoso. Ele descreve procedimentos como uso de redes de material emborrachado ou sintético ou caixas plásticas para

manuseio dos animais, a fim de garantir a segurança da equipe e reduzir danos ao animal, como lesão da delicada cauda.

Reynolds et al. (2017) afirmam que dadas outras opções disponíveis para reduzir o risco de acidentes durante o manuseio de potamotrigonídeos, a prática do corte do ferrão é desencorajada, a menos que o animal esteja em contato regular com manipuladores ou a bainha do ferrão tenha sido gravemente comprometida por trauma ou infecção. O motivo para isso é que os potamotrigonídeos parecem ser mais suscetíveis à infecção após o corte do ferrão do que seus equivalentes marinhos.

Após posicionar o animal em decúbito dorsal para permitir o acesso à cloaca, a colheita do sêmen pode ser feita por cateterização ou massagem.

A cateterização é realizada com uso de cateter urinário inserido por uma sonda para conferir rigidez e acoplado a uma seringa. O cateter é passado até a ampola dos vasos deferentes via papila urogenital e seio urogenital, e o sêmen cuidadosamente aspirado com a seringa. Essa técnica exige conhecimento detalhado da anatomia do animal com o qual se está trabalhando, pois existem diferenças na localização e conformação da papila urogenital entre as espécies (DALY, 2008; PENFOLD; WYFFELS, 2019).

Cosson et al. (2008) e Daly (2008) relataram problemas no uso do cateter, que incluem a dificuldade de realização da técnica sem que o animal esteja devidamente sedado e o tamanho do indivíduo, que pode tornar esse procedimento inviável.

Diversos autores declaram que a massagem é a técnica mais indicada para tubarões, sendo este o método mais efetivo, menos traumático, mais rápido para fazer com animal vivo e sem sedação (necessitando apenas da contenção física) e mais apropriado para animais pequenos, de fácil contenção e manipulação (DALY, 2008; JONES et al., 2010; PENFOLD; WYFFELS, 2019).

Em potamotrygonídeos, Dzyuba et al. (2019) utilizou a massagem para colheita de sêmen da cloaca em animais eutanasiados e até o momento, o trabalho de Padilha et al. (2021) foi o único que relatou o uso da técnica em raias vivas.

A Figura 8 ilustra o procedimento da massagem é feita por aplicação de pressão manual firme, mas suave, na extremidade distal do trato reprodutivo masculino, na região ventral. Essa pressão deve ser feita no sentido craniocaudal, com objetivo de drenar o sêmen armazenado nas ampolas dos ductos deferentes em direção à cloaca para que possa ser coletado com uso de tubo coletor ou seringa (DALY, 2008; DZYUBA et al., 2019; MORALES-GAMBA et al., 2019; PENFOLD; WYFFELS, 2019;

PADILHA et al., 2021). Durante a época de reprodução, as ampolas ficam desenvolvidas e repletas de conteúdo e Daly (2008) relata que elas podem ser sentidas através da parede do cólon, que fica ventral às ampolas.

Figura 8 - Diagrama esquemático da massagem para colheita de sêmen em *Potamotrygon*



Fonte: PADILHA et al. (2021)

Com o sêmen colhido, o material pode ser avaliado sob diversos aspectos como osmolalidade, concentração de eletrólitos e compostos orgânicos, concentração espermática, motilidade espermática e avaliação morfológica dos espermatozoides, além de testes de diluição e criopreservação (DALY, 2008; KESCHUMRAS, 2014; DZYUBA et al., 2019).

Morales-Gamba et al. (2019) avaliaram a integridade de membrana e presença de defeitos espermáticos em *Potamotrygon* de vida livre. Eles observaram que as raias de água doce possuem baixa quantidade de espermatozoides anormais e altos índices de células com membrana intacta, com índices por volta de 98%. O autor concluiu então que o sêmen desses peixes in natura tem alta qualidade em termos de morfologia.

Algumas espécies mantidas sob cuidados humanos podem ter condição espermática ruim. Deficiências nutricionais ou falta de pistas ambientais adequadas que poderiam prejudicar a produção espermática são hipóteses levantadas para explicar essa condição (PENFOLD; WYFFELS, 2019). Jones et al. (2010) alertam que é preciso também estar atento em relação ao ciclo reprodutivo, que apresenta variações de quantidade, qualidade e motilidade espermática ao longo das suas diferentes fases.

Daly (2008) avaliou a qualidade do sêmen e a integridade da membrana do esperma durante um ciclo sazonal completo e observou que durante o período de

acasalamentos, os espermatozoides apresentaram maior integridade de membrana, alta motilidade e formação de agregados que se movimentavam em conjunto. Do contrário, fora da estação de acasalamentos os espermatozoides eram vistos principalmente na forma individual, com baixos índices de integridade da membrana e muita variação de motilidade. O autor ainda sugere que para as espécies marinhas avaliadas em seu trabalho, o aumento da temperatura da água possa servir como uma pista ambiental para a retomada da espermatogênese.

O sêmen de elasmobrânquio tem se mostrado tolerante armazenado sob refrigeração, mantém boa motilidade com resfriamento a 4 °C por até 1 semana (DALY, 2008; JONES et al., 2010; PENFOLD; WYFFELS, 2019). Cosson et al. (2008) explicam que um dos objetivos principais do estudo de motilidade espermática em peixes é determinar duas soluções: uma solução que previna a motilidade enquanto preserva o esperma por um período determinado mantendo seu potencial de motilidade (“non-swimming solution”) e outra que permita a ativação e manutenção da motilidade pelo período mais longo possível (“swimming solution”). Para isso preciso saber muito bem a composição iônica dos fluidos envolvidos no processo reprodutivo.

A inseminação artificial é uma técnica essencial para o transporte de genes e manejo genético de populações isoladas, como grupos de apenas um sexo em aquários (PENFOLD; WYFFELS, 2019), além de ser uma ferramenta muito importante no auxílio à conservação de espécies ameaçadas como muitos dos elasmobrânquios. Em 2010, Jones et al. (2010) declararam que não havia gestações por inseminação artificial em elasmobrânquios. Os estudos realizados até aquele momento mostravam que era possível obter sêmen vivo após a descongelação, mas as amostras tinham pouca motilidade e não duravam mais do que 15 minutos. Após nove anos, (PENFOLD; WYFFELS, 2019) citou várias espécies nas quais já foi feita inseminação artificial, mostrando que os estudos a respeito da reprodução assistida em elasmobrânquios ainda tem muito a evoluir.

Penfold e Wyffels (2019) afirmaram que a resiliência ao resfriamento e longevidade do espermatozoide elasmobrânquico se presta bem à inseminação artificial, mas a criopreservação desse material ainda não é amplamente praticada por dificuldades como as transições de fase da membrana em temperaturas críticas, que estão atualmente impedindo o desenvolvimento de protocolos para congelação de espermatozoides de tubarão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ-USP) sob o protocolo nº 2227140521.

Foi enviada solicitação de autorização ou licença pelo SISBIO (solicitação nº 65865), a qual foi dispensada com base no parágrafo 2º, do Artigo 3º, da IN 03/14, sob a justificativa de que se tratavam de animais já mantidos em condições de cativeiro e que a pesquisa não ocorreu em UC Federal.

3.1 ANIMAIS E AMBIENTE

Para a realização deste projeto, foram utilizados 8 exemplares machos de raias do gênero *Potamotrygon*, sendo 4 animais da espécie *P. falkneri* e 4 da espécie *P. motoro*. Os indivíduos foram identificados pelo número do microchip e denominados neste trabalho por F1 a F4 e M1 a M4 conforme o Quadro 1.

Quadro 1 - Identificação dos animais do experimento

Identificação do animal	Espécie	Número do microchip
F1	<i>Potamotrygon falkneri</i>	7509
F2	<i>Potamotrygon falkneri</i>	7505
F3	<i>Potamotrygon falkneri</i>	8274
F4	<i>Potamotrygon falkneri</i>	7495
M1	<i>Potamotrygon motoro</i>	8882
M2	<i>Potamotrygon motoro</i>	8952
M3	<i>Potamotrygon motoro</i>	2077
M4	<i>Potamotrygon motoro</i>	8321

Fonte: RAMOS (2021).

Todos os animais pertenciam ao Aquário de São Paulo, localizado na cidade de São Paulo – SP (23°35'36.5"S 46°36'51.1"W) e eram mantidos com rotina de limpeza, alimentação, condições ambientais e de saúde sob responsabilidade da instituição. Eles estavam situados em 3 tanques distintos com condições descritas no Quadro 2, mas o pH da água em todos era mantido próximo a 7.0.

Quadro 2 - Tanques de manutenção dos animais

Tanque	Características	Temperatura da água
Exposição lancheonete	Tanque localizado em baixo de uma escada próximo à área de lancheonete. Possuía alguns indivíduos machos de <i>P. falkneri</i> e <i>P. motoro</i>	26,5 °C
Quarentena	Tanques compostos por caixas d'água com animais mantidos individualmente	26,8 °C
Exposição chão de vidro	Tanque localizado na área de exposição aos visitantes, com parte em baixo de um chão de vidro. Possuía alguns indivíduos de <i>P. falkneri</i> e <i>P. motoro</i> .	27,1 °C

Fonte: RAMOS (2021).

3.2 BIOMETRIA E COLHEITA DE SÊMEN

Os animais foram contidos fisicamente pelos colaboradores do Aquário, que possuem vasta experiência no manejo destes animais a fim de isolar o ferrão e evitar qualquer tipo de acidente com a equipe envolvida. Os animais foram retirados da água com puçá, pesados e então posicionados em decúbito dorsal em uma bandeja plástica com base de espuma (Figura 9). As raias liberam um muco escorregadio na superfície do corpo, principalmente quando manipuladas, e a espuma evita que o animal escorregue pela bandeja, auxiliando a contenção.

A colheita foi realizada dia 07/06/2021 no período da manhã. Durante o procedimento, uma pessoa ficou exclusivamente responsável pela contenção do animal, enquanto outra realizou as medidas biométricas e uma terceira pessoa procedeu com a massagem para colheita do sêmen. Todos os animais foram manipulados pelas mesmas pessoas para que houvesse padronização no manejo e na obtenção dos dados.

Os dados biométricos avaliados estão representados no esquema da Figura 10 e discriminados no Quadro 3. Os dados de comprimento do disco, largura do disco e comprimento do cláster foram obtidos conforme ROSA (1985) e mensurados com uso de fita métrica. Adicionamos o dado de diâmetro do cláster, que foi obtido com uso de paquímetro calibrado na porção onde o órgão copulatório possuía maior espessura.

Para a colheita de sêmen, a região da cloaca do animal foi higienizada e seca com uso de papel absorvente, para então realizar massagem em sentido craniocaudal na região das vesículas seminais, conforme descrito por (PADILHA et al., 2021).

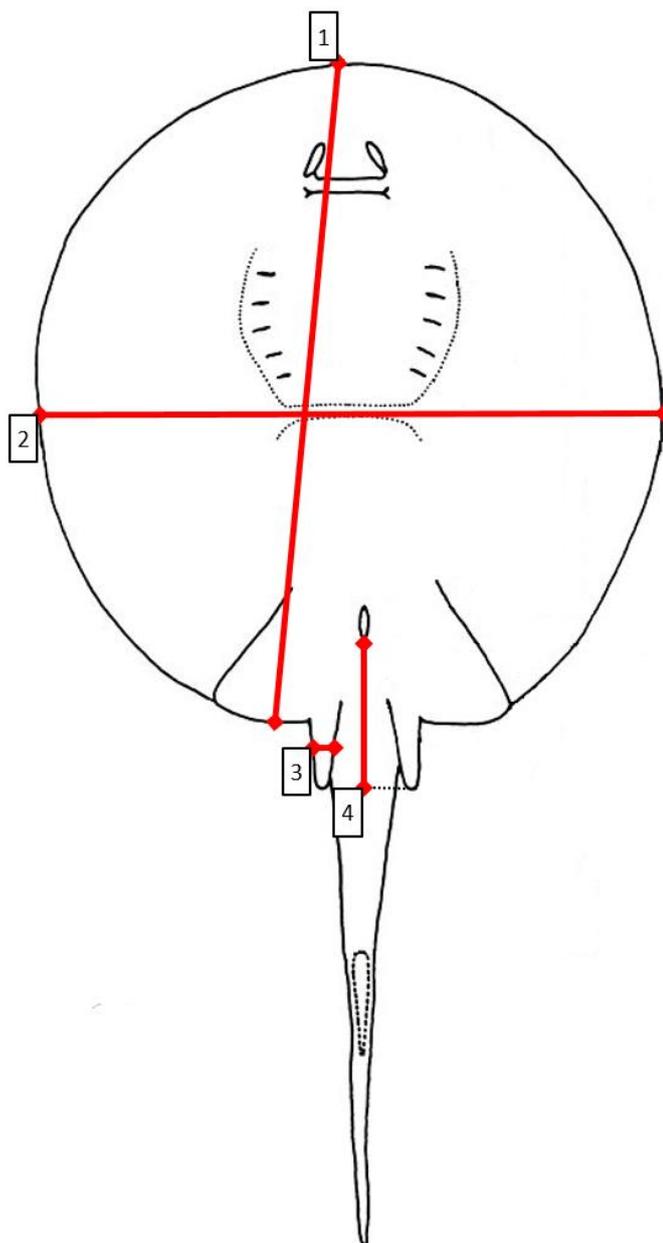
Foram colhidos cerca de 5mL de sêmen e todo o processo foi otimizado de forma que o animal não ficasse contido por mais de 5 minutos, para então poder retornar à água no tanque.

Figura 9 - Posicionamento do animal e biometria



Fonte: Helen Colbachini (2021)

Figura 10 - Esquema de dados biométricos



Fonte: RAMOS (2021) adaptado de ROSA (1985).

Quadro 3 - Dados biométricos

Número da medida	Nome da medida	Descrição
1	Comprimento do disco	Maior distância da ponta do nariz à margem posterior do disco
2	Largura do disco	Maior distância entre as margens laterais do disco
3	Diâmetro do clássper	Maior distância entre as margens laterais do clássper
4	Comprimento do clássper	Distância da margem posterior da cloaca à ponta do clássper

Fonte: RAMOS (2021) adaptado de ROSA (1985).

3.3 AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA

O sêmen colhido foi mantido em tubo falcon graduado e refrigerado em caixa de isopor com gelo. O material foi transportado até a sede da IMV Technologies em Campinas – SP, onde a motilidade foi avaliada por sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) no equipamento IVOS II (IMV Technologies) ao longo de 18 dias. As configurações padronizadas (Setup) para leitura do material pelo equipamento estão especificadas no Apêndice A. Para essas análises, o sêmen foi diluído nos meios de preservação INRA 96 (IMV Technologies) e Optidux (solução de Optixcell da Reprodux) de acordo com a proporção indicada no Quadro 4, que foi ajustada conforme visualização da concentração na tela do computador, a fim de evitar a sobreposição das células, o que dificultava a análise pelo sistema computadorizado.

Quadro 4 - Diluição do sêmen para avaliação no sistema CASA

Identificação do Animal	Diluição
F1	1 : 200
F2	1 : 200
F3	1 : 400
F4	1 : 200
M1	1 : 200
M2	1 : 200
M3	1 : 100
M4	1 : 200

Fonte: RAMOS (2021).

Para certificar que os espermatozoides se movimentassem sem interferências mecânicas externas durante a avaliação pelo equipamento CASA, foram utilizadas câmaras de contagem Leja ®. Elas são pré-calibradas com profundidade precisa e constante, garantindo a livre movimentação das células em seu interior.

No primeiro dia, o sêmen refrigerado foi adicionado ao diluente em micro tubos e avaliado em dois momentos: assim que retirado da caixa refrigerada (diluente INRA com média de 12,9 °C e Optixcell com média de 20,1 °C) e após 30 minutos em contato com mesa aquecida à 37 °C. Nos outros dias o material foi avaliado somente após se manter sobre a mesa aquecida.

Uma parte do material foi também armazenada em solução de glutaraldeído 2,5 % com tampão DPBS 9,6 g/L e mantida refrigerada para execução de microscopia

eletrônica de varredura e transmissão, que será realizada após a retomada das atividades dos laboratórios, interrompidas devido às restrições sanitárias impostas por conta da pandemia da COVID-19.

3.4 CRIOPRESERVAÇÃO

O procedimento de congelação do sêmen foi realizado no dia seguinte à colheita e usados os mesmos diluentes: Optixcell e INRA. Diferente do Optixcell, que já possui crio preservador em sua composição, o INRA teve DMSO adicionado para proteger as células espermáticas durante a congelação. Dessa forma, a diluição do sêmen no crio preservador foi padronizada em 1 : 50, com inclusões de DMSO de 278 μ L e 173 μ L. O processo de congelação em câmara fria levou 20 minutos.

A avaliação do sêmen crio preservado foi feita dia 28/07/2021, 57 dias após a congelação. Três palhetas de cada partida foram descongeladas e homogeneizadas para compor a amostra de cada um dos animais. Elas foram colocadas em banho-maria a 37 °C por um minuto. Em seguida, com auxílio de um instrumento metálico fino, o sêmen foi pressionado para fora das palhetas e transferido para um único tubo eppendorf, de forma que não houvesse tempo dos espermatozoides se locomoverem ao longo da palheta formando gradientes de células com motilidades diferentes. Conforme padronizado no primeiro dia de análise, os tubos eppendorf foram então mantidos em mesa aquecida a 37 °C por 30 minutos antes de prosseguir com a avaliação pelo CASA.

O sêmen descongelado foi diluído na proporção 1:1 para avaliação no CASA, com exceção do animal F3, que foi diluído na proporção 1:2 e do animal M3 que não foi diluído.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados biométricos foram descritos na forma de média e desvio padrão dos valores quantitativos obtidos.

A normalidade de todos os dados obtidos foi testada pelo teste Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram analisados pelo teste t-Student e não paramétricos pelo teste Wilcoxon. Para avaliar correlação, foi usado o teste Spearman.

Para todos os testes foi considerado nível de significância de 95% ($P \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

Os dados referentes à biometria estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados biométricos

Medidas	<i>P. falkneri</i>	<i>P. motoro</i>
Peso (kg)	2.483 ± 0.2961 (4)	1.466 ± 0.3737 (4)
Comprimento do disco (cm)	39.480 ± 1.2840 (4)	32.550 ± 2.6110 (4)
Largura do disco (cm)	36.550 ± 0.9574 (4)	31.150 ± 1.8060 (4)
Diâmetro do cláster Direito (cm)	1.850 ± 0.5260 (4)	1.650 ± 0.1291 (4)
Diâmetro do cláster Esquerdo (cm)	1.850 ± 0.4041 (4)	1.675 ± 0.2630 (4)
Comprimento do cláster Direito (cm)	10.130 ± 0.7500 (4)	9.600 ± 0.6633 (4)
Comprimento do cláster Esquerdo (cm)	9.875 ± 0.2872 (4)	9.425 ± 0.6994 (4)

Fonte: RAMOS (2021).

Legenda: Valores de média e desvio padrão para os dados biométricos obtidos para *P. falkneri* e *P. motoro*.

O sêmen foi avaliado quanto ao aspecto visual (macroscópico) e as características observadas para cada animal estão descritas no Quadro 5.

Quadro 5 - Aspecto macroscópico do sêmen

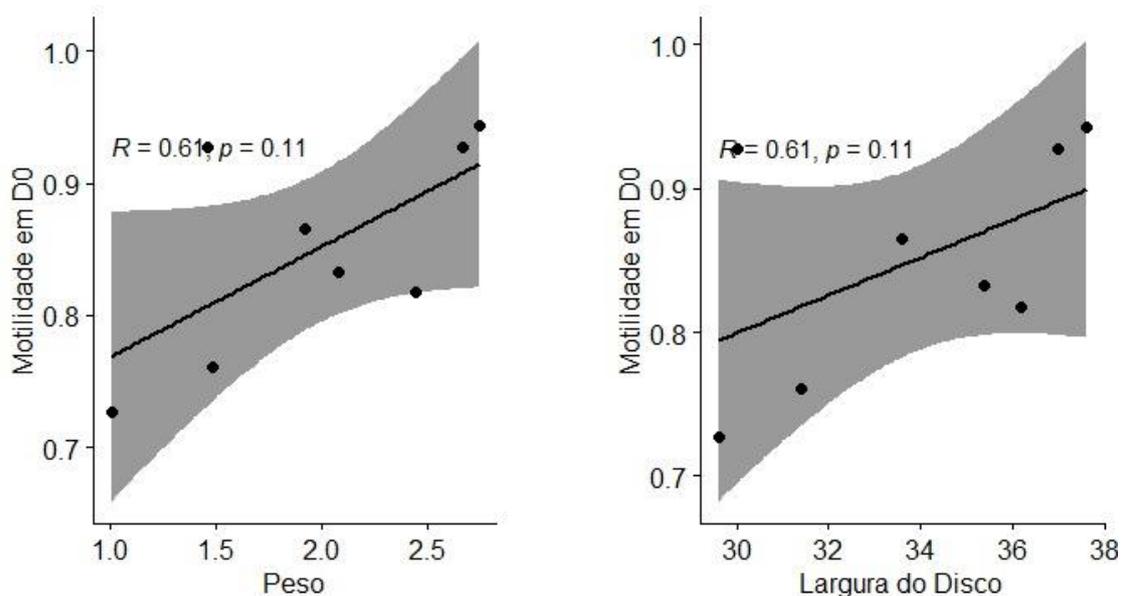
Identificação do Animal	Características macroscópicas do sêmen
F1	Muito viscoso e presença de grumos
F2	Bem viscoso e presença de grumos
F3	Viscoso e presença de grumos
F4	Pouco viscoso e presença de grumos
M1	Pouco viscoso
M2	Viscoso
M3	Líquido e presença de grumos
M4	Pouco viscoso e presença de grumos (amostra dividida em dois tubos e um deles coagulou)

Fonte: RAMOS (2021).

Ao correlacionar a motilidade no INRA no dia zero com o peso e largura do disco dos indivíduos, os valores apresentaram distribuição normal ($p=0,4589$) e o teste Spearman não confirmou existência de correlação entre as variáveis para o diluente

($p=0.1077$ com $\rho=0.6107894$). Porém, há indícios de que exista uma correlação positiva moderada entre o peso e a motilidade em INRA (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Correlação entre motilidade no INRA no dia zero com peso e largura do disco



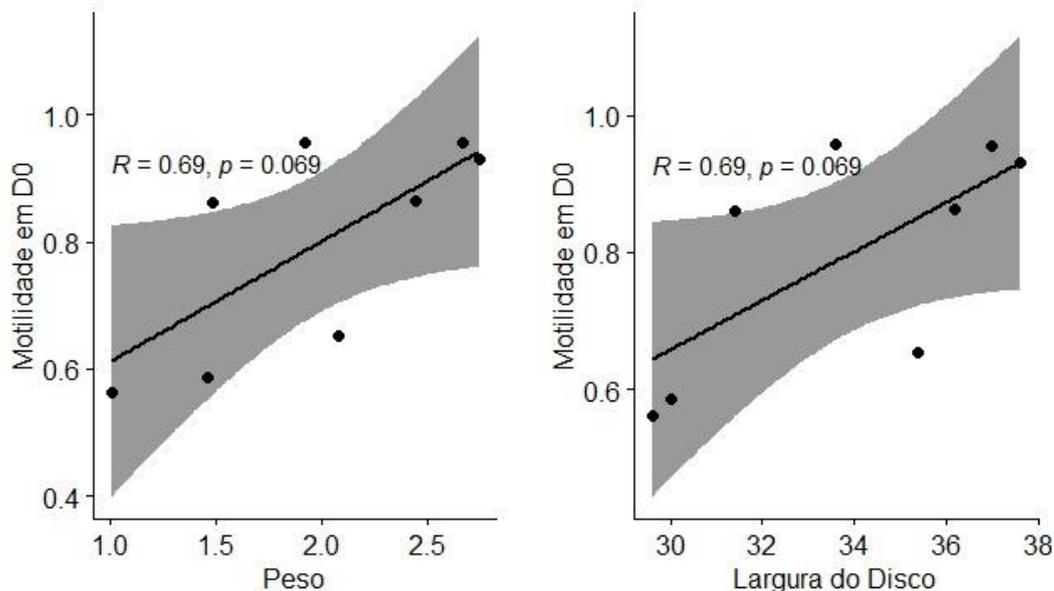
Fonte: RAMOS (2021)

Legenda: Correlação entre a motilidade no INRA no dia zero com o peso e largura do disco. O teste Shapiro-Wilk indicou distribuição normal ($p=0,4589$) e o teste Spearman não confirmou existência de correlação entre as variáveis ($p=0,1077$ com $\rho=0,6107894$).

Na correlação da motilidade no Optixcell no dia zero com o peso e largura do disco dos indivíduos, os valores apresentaram distribuição normal ($p=0,05807$) e o teste Spearman não confirmou existência de correlação entre as variáveis para o diluente ($p=0.06939$ com $\rho=0.6904762$). Porém, há indícios de que exista uma correlação positiva moderada entre o peso e a motilidade em Optixcell (Gráfico 2).

No primeiro dia, o sêmen mantido sobre mesa aquecida parecia visualmente melhor que o sêmen refrigerado e por conta disso esse aquecimento prévio foi padronizado para os demais dias de análise. Apesar disso, a análise estatística feita posteriormente mostrou que a motilidade não diferiu em relação à temperatura dos diluente. Os valores não apresentaram distribuição normal ($p=0.0002834$ para o INRA e $p=0.001118$ para o Optixcell) e os valores de P dos testes Wilcoxon foram 1 para o INRA e 0,25 para o Optixcell. A distribuição dos dados do INRA está representada no Gráficos 3, e do Optixcell no Gráfico 4.

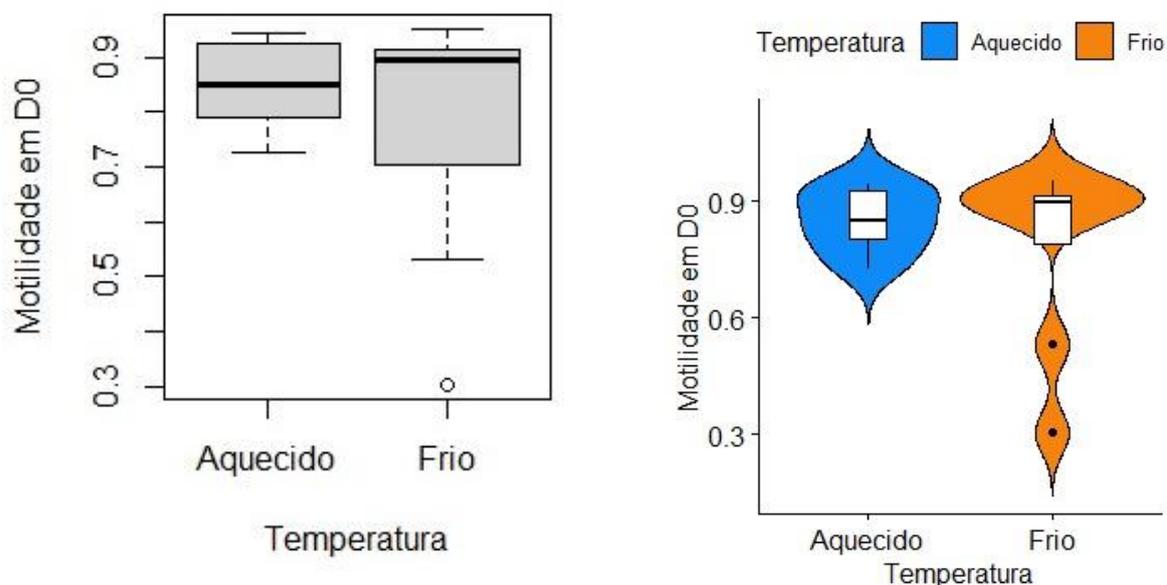
Gráfico 2 - Correlação entre motilidade no Optixcell no dia zero com peso e largura do disco



Fonte: RAMOS (2021)

Legenda: Correlação entre a motilidade no Optixcell no dia zero com o peso e largura do disco. O teste Shapiro-Wilk indicou distribuição normal ($p=0,05807$) e o teste Spearman não confirmou existência de correlação entre as variáveis ($p=0,06939$ com $\rho=0,6904762$).

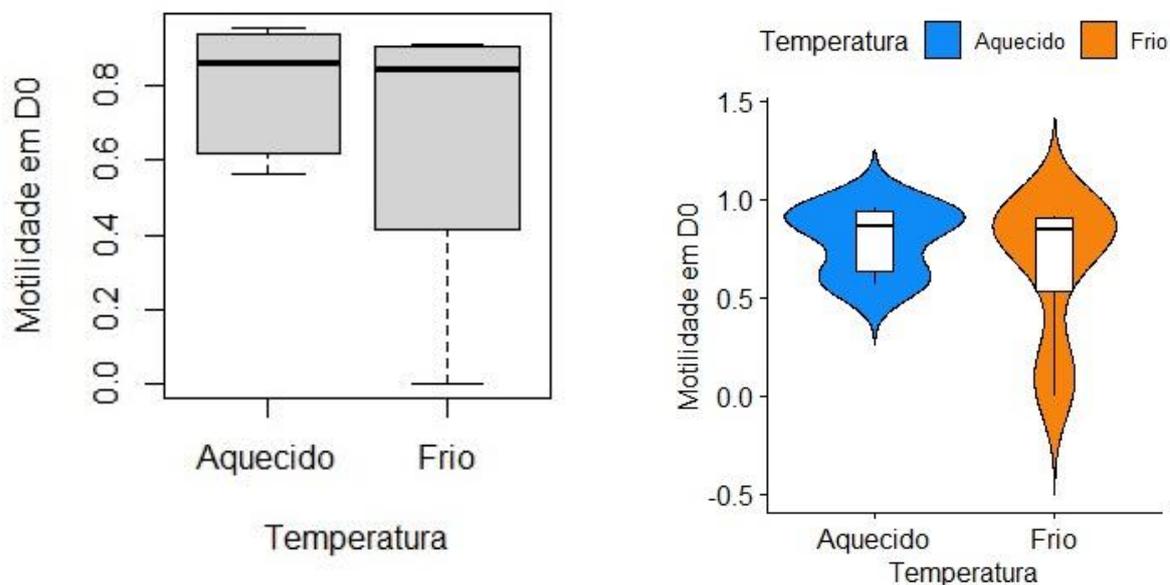
Gráfico 3 - Gráficos boxplot e violinplot da motilidade em relação à temperatura no diluente INRA



Fonte: RAMOS (2021)

Legenda: Gráficos boxplot e violinplot dos valores médios de motilidade do dia zero no diluente INRA aquecido e refrigerado. O teste Shapiro-Wilk indicou distribuição não-normal ($p=0,0002834$) e o teste Wilcoxon mostrou que não há diferença ($p=1$) entre as motilidades no diluente em diferentes temperaturas.

Gráfico 4 - Gráficos boxplot e violinplot da motilidade em relação à temperatura no diluente Optixcell



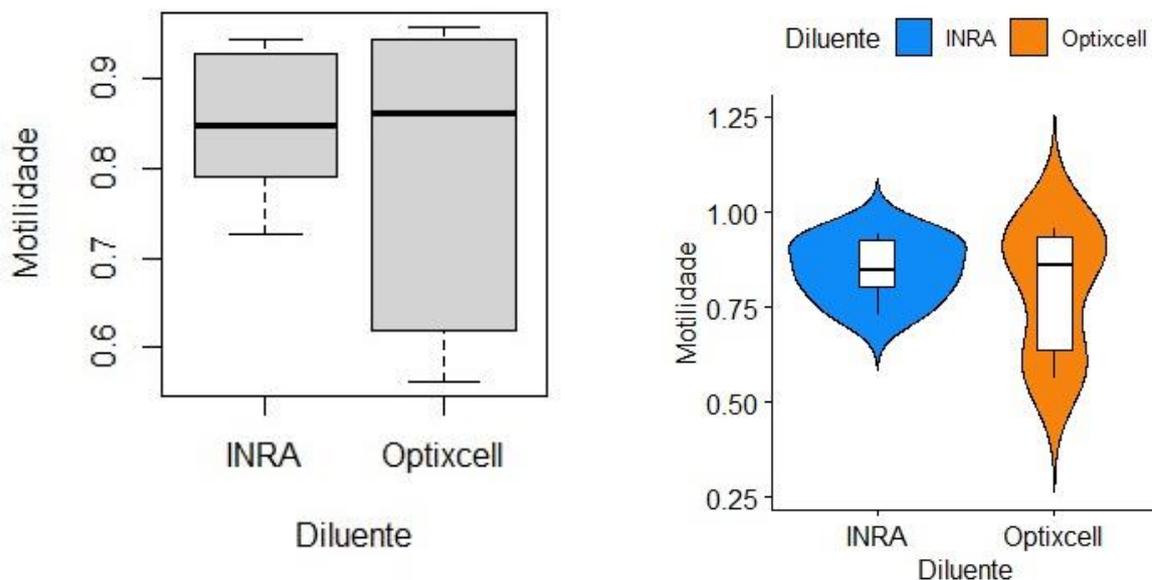
Fonte: RAMOS (2021)

Legenda: Gráficos boxplot e violinplot dos valores médios de motilidade do dia zero no diluente Optixcell aquecido e refrigerado. O teste Shapiro-Wilk indicou distribuição não-normal ($p=0,001118$) e o teste Wilcoxon mostrou que não há diferença ($p=0,25$) entre as motilidades no diluente em diferentes temperaturas.

Ainda no primeiro dia, à avaliação visual aparentava que a motilidade no Optixcell era melhor em relação ao INRA. A coloração translúcida do diluente facilita a visualização e identificação das células pelo sistema CASA, mas estatisticamente os valores de motilidade não mostraram diferença, indicando valores não normais ($p=0,02921$) e $p=0,6406$ no teste Wilcoxon (Gráfico 5).

Os valores médios de motilidade dos espermatozoides nos diluentes INRA e Optixcell ao longo dos 18 dias estão expostos na Tabela 2, com as curvas representadas no Gráfico 6.

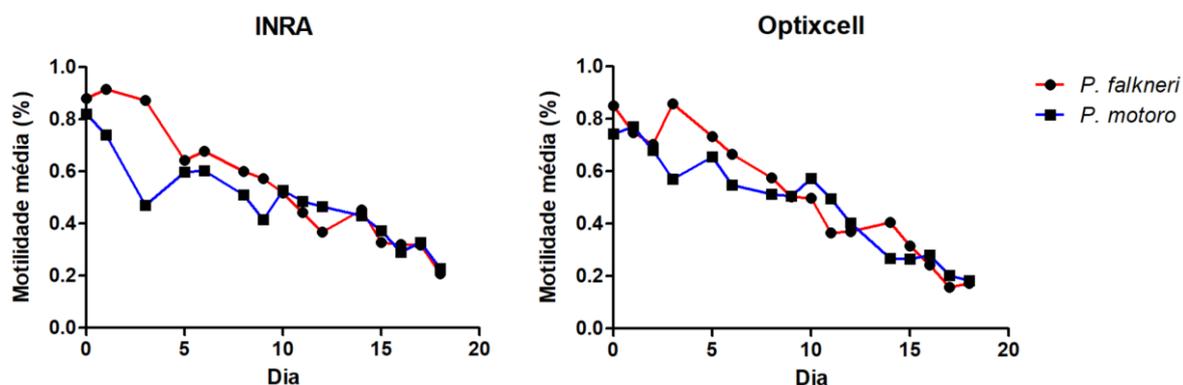
Gráfico 5 - Gráficos boxplot e violinplot da motilidade no dia zero em relação ao diluente



Fonte: RAMOS (2021)

Legenda: Gráficos boxplot e violinplot dos valores médios de motilidade do dia zero nos diluentes INRA e Optixcell. O teste Shapiro-Wilk indicou distribuição não-normal ($p=0,02921$) e o teste Wilcoxon mostrou que não há diferença ($p=0,6406$) de motilidade nos diferentes diluentes.

Gráfico 6 - Valores médios de motilidade espermática nos diluentes INRA e Optixcell



Fonte: RAMOS (2021)

Legenda: A curva mostra os valores médios diários da motilidade espermática de *P. falkneri* e *P. motoro* nos diluentes INRA 96 e Optidux (solução de Optixcell) ao longo de 18 dias de avaliação pelo sistema CASA.

Tabela 2 - Motilidade média diária

Dias	INRA		Optixcell	
	<i>P. falkneri</i>	<i>P. motoro</i>	<i>P. falkneri</i>	<i>P. motoro</i>
D0	0,880 ± 0,0641 (4)	0,820 ± 0,0924 (4)	0,850 ± 0,1371 (4)	0,742 ± 0,1970 (4)
D1	0,915 ± 0,0388 (4)	0,740 ± 0,1485 (4)	0,748 ± 0,2735 (4)	0,771 ± 0,2184 (4)
D2	-	-	0,702 ± 0,3269 (4)	0,681 ± 0,1806 (4)
D3	0,872 ± 0,0562 (4)	0,471 ± 0,2902 (4)	0,858 ± 0,0631 (4)	0,571 ± 0,3009 (4)
D5	0,644 ± 0,2442 (4)	0,599 ± 0,1914 (4)	0,734 ± 0,2850 (4)	0,654 ± 0,2178 (4)
D6	0,678 ± 0,1493 (4)	0,604 ± 0,2141 (4)	0,667 ± 0,2336 (4)	0,547 ± 0,3411 (4)
D8	0,600 ± 0,2219 (4)	0,510 ± 0,2677 (4)	0,575 ± 0,3175 (4)	0,514 ± 0,3117 (4)
D9	0,573 ± 0,2077 (4)	0,416 ± 0,2991 (4)	0,503 ± 0,3232 (4)	0,506 ± 0,3876 (4)
D10	0,518 ± 0,2798 (4)	0,529 ± 0,2343 (4)	0,499 ± 0,3276 (4)	0,574 ± 0,2695 (4)
D11	0,443 ± 0,2076 (4)	0,486 ± 0,2591 (4)	0,364 ± 0,2421 (4)	0,497 ± 0,3167 (4)
D12	0,369 ± 0,2630 (4)	0,464 ± 0,1760 (4)	0,372 ± 0,2741 (4)	0,402 ± 0,2805 (4)
D14	0,454 ± 0,2011 (4)	0,429 ± 0,2008 (4)	0,405 ± 0,2741 (4)	0,268 ± 0,1840 (4)
D15	0,327 ± 0,1753 (4)	0,373 ± 0,2378 (4)	0,316 ± 0,2538 (4)	0,265 ± 0,1658 (4)
D16	0,320 ± 0,2351 (4)	0,291 ± 0,2920 (4)	0,244 ± 0,2361 (4)	0,281 ± 0,2735 (4)
D17	0,317 ± 0,3027 (4)	0,328 ± 0,2763 (4)	0,158 ± 0,1712 (4)	0,204 ± 0,2709 (4)
D18	0,208 ± 0,1836 (4)	0,229 ± 0,2234 (4)	0,174 ± 0,2745 (4)	0,184 ± 0,1893 (4)

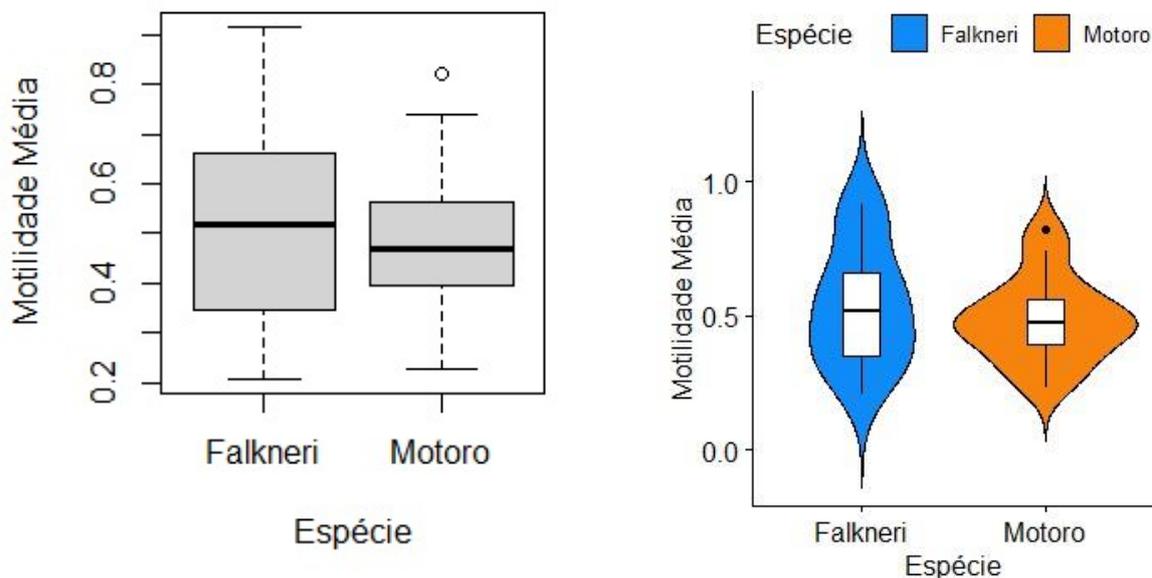
Fonte: RAMOS (2021)

Legenda: Valores de média e desvio padrão para os dados de motilidade diários de *P. falkneri* e *P. motoro*.

Ao avaliar se havia diferença entre os valores médios de motilidade diários no diluente INRA e a espécie, os valores apresentaram distribuição normal ($p=0,1804$) e o valor de P do teste t-Student foi 0,09701, mostrando que a motilidade média de *P. falkneri* e *P. motoro* no diluente INRA não diferem entre si (Gráfico 7).

Para os valores médios de motilidade diários no diluente Optixcell e as espécies, os valores apresentaram distribuição normal ($p=0,195$) e o valor de P do teste t-Student foi 0,2282, mostrando que a motilidade média de *P. falkneri* e *P. motoro* no diluente Optixcell também não diferem entre si (Gráfico 8).

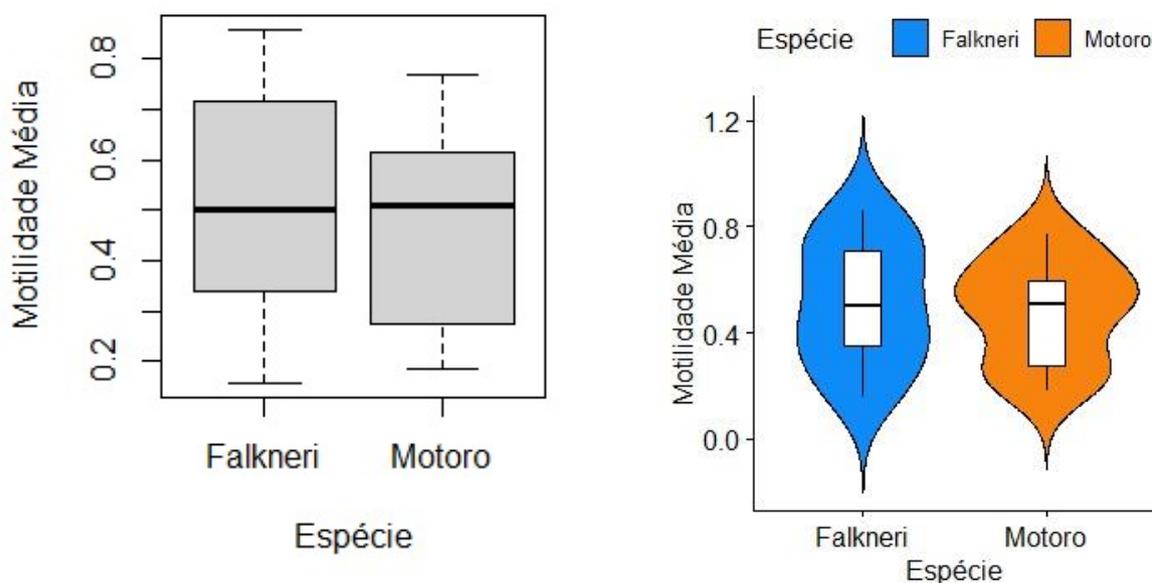
Gráfico 7 - Gráficos boxplot e violinplot da motilidade em relação à espécie no diluente INRA



Fonte: RAMOS (2021)

Legenda: Gráficos boxplot e violinplot dos valores médios de motilidade diários no diluente INRA de *P. falkneri* e *P. motoro*. O teste Shapiro-Wilk indicou distribuição normal ($p=0,1804$) e o teste t-Student mostrou que não há diferença ($p=0,09701$) entre as motilidades das espécies neste diluente.

Gráfico 8 - Gráficos boxplot e violinplot da motilidade em relação à espécie no diluente Optixcell

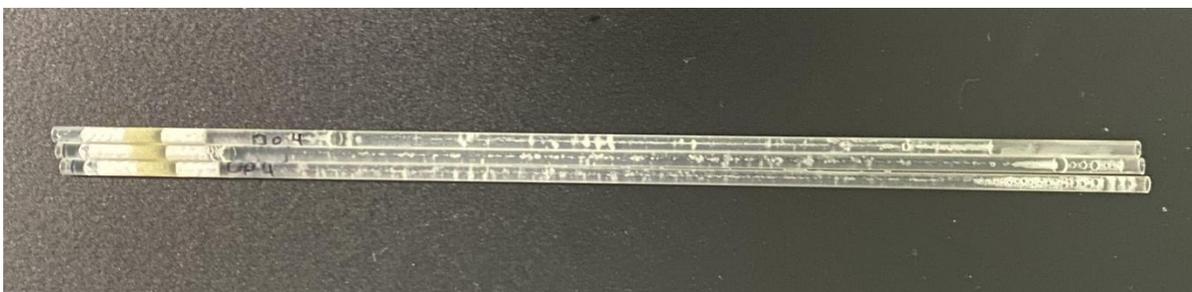


Fonte: RAMOS (2021)

Legenda: Gráficos boxplot e violinplot dos valores médios de motilidade diários no diluente Optixcell de *P. falkneri* e *P. motoro*. O teste Shapiro-Wilk indicou distribuição normal ($p=0,195$) e o teste t-Student mostrou que não há diferença ($p=0,2282$) entre as motilidades das espécies neste diluente.

Após a descongelação, foi observado que o sêmen dos animais F3, M1 e M3 formou coágulos dentro da palheta (a Figura 11 mostra as palhetas do animal F3). Apesar disso, após transferência do material para o tubo eppendorf, homogeneização e diluição, isso não interferiu nas análises do CASA.

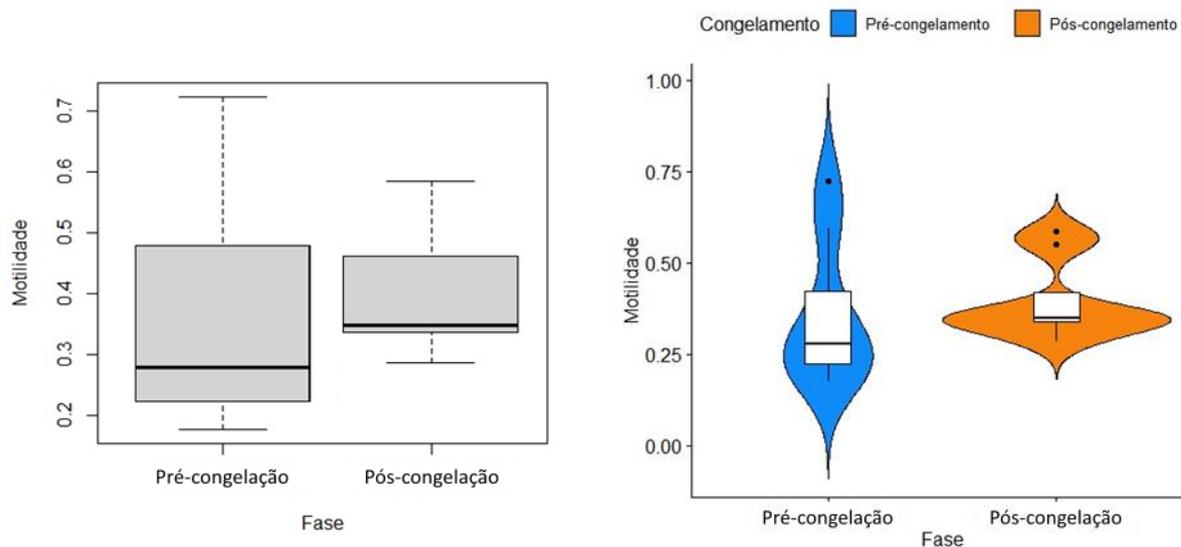
Figura 11 - Formação de grumos dentro da palheta



Fonte: RAMOS (2021)

Os valores de motilidade pré e pós congelação com solução de INRA com DMSO apresentaram distribuição normal ($p=0,05322$) e o valor de P do teste t-Student foi 0,6226, mostrando que a motilidade não difere estatisticamente após o processo (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Gráficos boxplot e violinplot da motilidade no INRA com DMSO pré e pós congelação



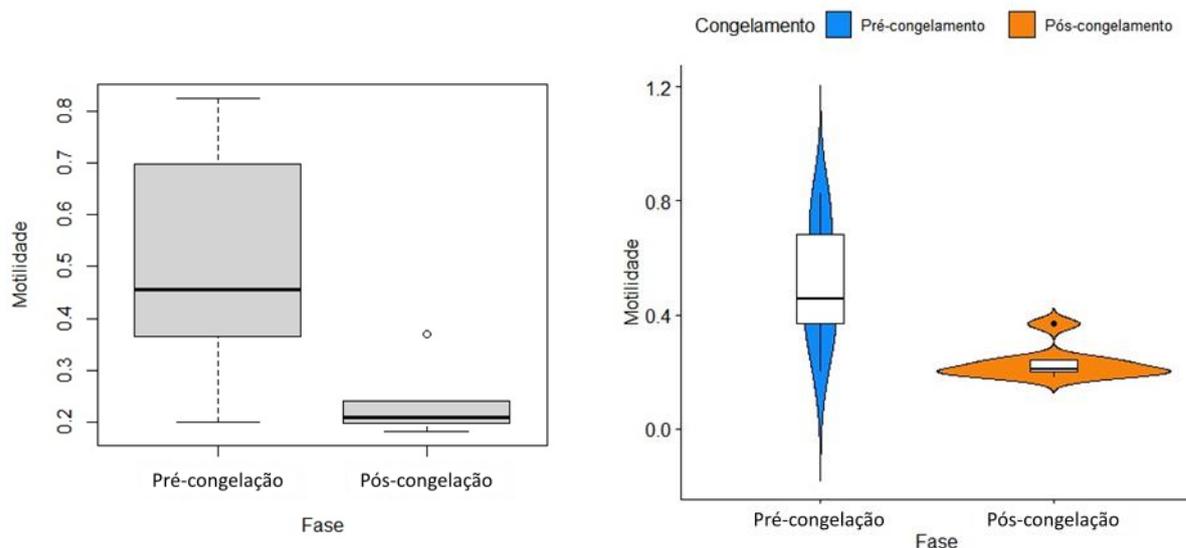
Fonte: RAMOS (2021)

Legenda: Gráficos boxplot e violinplot dos valores médios de motilidade antes e após o processo de congelação no diluente INRA com criopreservador DMSO. O teste Shapiro-Wilk indicou distribuição normal ($p=0,05322$) e o teste t-Student mostrou que não há diferença ($p=0,6226$) entre as motilidades.

Com o diluente e crio preservador Optixcell, os dados de motilidade não apresentaram distribuição normal ($p=0,0059$) e o valor de P do teste Wilcoxon foi 0,0156, mostrando que a motilidade foi significativamente diferente após o processo de congelação (Gráfico 10).

Os valores da motilidade pós descongelação em relação ao pré congelação para cada indivíduo estão expressos em forma de porcentagem na Tabela 3.

Gráfico 10 - Gráficos boxplot e violinplot da motilidade no Optixcell pré e pós congelação



Fonte: RAMOS (2021)

Legenda: Gráficos boxplot e violinplot dos valores médios de motilidade antes e após o processo de congelação no diluente Optixcell. O teste Shapiro-Wilk indicou distribuição não normal ($p=0,0059$) e o teste Wilcoxon mostrou que há diferença ($p=0,0156$) entre as motilidades.

Tabela 3 - Porcentagem de motilidade pós descongelação

Animal	INRA + DMSO (%)	Optixcell (%)
F1	98,32	50,55
F2	11,18	51,27
F3	47,99	24,36
F4	186,36	49,66
M1	78,30	42,44
M2	168,02	52,27
M3	141,74	121,00
M4	247,75	36,28

Fonte: RAMOS (2021)

Legenda: Porcentagem da motilidade pós descongelação em relação à pré congelação para cada indivíduo.

5 DISCUSSÃO

Por se tratarem de animais pequenos (que apresentaram o máximo comprimento do disco por volta de 40 cm) e de fácil manipulação, conseguimos realizar a massagem para colheita do sêmen apenas com uso de contensão física, conforme recomendado na literatura (DALY, 2008; JONES et al., 2010; DZYUBA et al., 2019; PENFOLD; WYFFELS, 2019; PADILHA et al., 2021). O procedimento exigiu equipe de manejo capacitada para o isolamento do ferrão venenoso e execução coordenada da atividade, mas dispensou a necessidade de anestesia ou sedação relatada por Daly (2008). Essa recomendação está diretamente relacionada ao tamanho das raias, sendo necessária em caso de indivíduos com grande porte, nos quais a manipulação e imobilização do animal é mais difícil.

Os machos de *P. falkneri* reprodutivamente ativos utilizados neste estudo obtiveram valores de diâmetro do disco variando entre 35,4 e 37,6 cm, bem acima dos 26 cm definidos na literatura como limitantes para o início da atividade sexual (SILVA; GOULART, 2007; GARRONE NETO, 2010). Por outro lado, os machos de *P. motoro* obtiveram valores de diâmetro do disco que variaram entre 29,6 e 33,6 cm. Esses tamanhos encontram-se abaixo dos 39 cm definidos para a espécie por Charvet-Almeida, De Araújo e De Almeida (2005), mas acima dos 23 a 27 cm relatados por outros autores (THORSON; LANGHAMMER; OETINGER, 1983; SILVA; GOULART, 2007; GARRONE NETO, 2010). Dessa forma, podemos dizer que os machos utilizados neste trabalho estavam dentro dos padrões reprodutivos citados pela maioria dos autores na literatura.

O tamanho do disco é diretamente proporcional ao peso dos animais e quanto maior a largura do disco, maior o seu peso. Por isso que ao correlacionar a motilidade espermática nos diferentes diluentes com os valores biométricos, obtivemos o mesmo gráfico para as variáveis peso e largura do disco (Gráficos 1 e 2).

Apesar do tamanho e peso do animal não mostrarem correlação estatisticamente significativa com a motilidade nos diluentes INRA e Optixcell, há indícios de que exista uma correlação positiva moderada. A não significância estatística faz sentido considerando que tanto o tamanho do animal quanto a motilidade espermática vão aumentando até atingirem um limite máximo. Como todos os animais utilizados neste trabalho já eram considerados reprodutivamente maduros, é provável que já estivessem próximos do ápice desse limite. Possivelmente este tipo

de correlação estatística fizesse mais sentido avaliando a motilidade de indivíduos machos que se encontram ao longo do processo de maturação, nos quais tanto a estrutura corporal quanto a motilidade espermática ainda apresentam potencial de aumento.

O animal M3 apresentou o sêmen mais diluído, que foi uma característica observada inclusive macroscopicamente, pela consistência da amostra com aspecto líquido. Coincidentemente ou não, este foi o menor indivíduo avaliado, tanto em relação ao peso e medidas do disco, como para comprimento e diâmetro do cláster direito. Apesar disso, este animal apresentou o cláster totalmente calcificado e valores biométricos condizentes com os citados na literatura para um macho reprodutivamente ativo, como citado anteriormente.

Pedrerros-Sierra, Ramírez-Pinilla (2015) relataram que o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos de um Potamotrygonídeo macho é assíncrono, com as estruturas reprodutivas atingindo seu completo desenvolvimento em momentos distintos. Porém, afirmam que a completa calcificação dos clásteres só ocorre bem depois do total desenvolvimento dos órgãos internos. Apesar disso, Clark e Von Schmidt (1965) declaram terem flagrado alguns exemplares de tubarões marinhos com os clásteres calcificados, porém com órgãos reprodutivos internos não totalmente desenvolvidos.

Outro fator que pode ter contribuído para esta variação individual é o ambiente limitado do cativeiro. Lyons et al. (2017) sugeriram que esta condição esteja relacionada à forte competição espermática e se depararam com uma variabilidade na massa testicular dos indivíduos. Eles fizeram essa declaração baseados na restrição espacial que pode alterar a dinâmica natural de cópulas mas, além disso, não podemos deixar de especular que a manutenção de uma população restrita pode ser capaz de alterar também toda a comunicação química e pistas ambientais relacionadas à produção espermática (PENFOLD; WYFFELS, 2019).

Sabemos que o ejaculado é composto por uma mistura de espermatozoides, fluido da vesícula seminal, fluido da glândula alcalina e/ou urina (DZYUBA et al., 2019). Com a colheita através da massagem no ventre do animal, é impossível impedir a mistura de diferentes proporções desses fluidos. Isso pode ter resultado na observação amostras muito diluídas ou muito concentradas dos indivíduos M3 e F3 respectivamente, e para ter uma estimativa mais precisa desse dado seria necessário avaliar as características químicas de cada amostra.

No nosso trabalho com as raias, foi observado movimento do cláspere durante a massagem para colheita de sêmen. De acordo com as causas e funções levantadas por Colbachini et al. (2018) para o movimento dessas estruturas, podemos ressaltar que os animais do nosso estudo estavam fora da água, então os movimentos não tiveram relação com hormônios sexuais presentes no ambiente aquático. Como essa mobilidade foi vista durante a manipulação e existem relatos de movimento dos clásperes em comportamentos agonísticos, isso pode estar relacionado com estresse do animal. Outra explicação mais provável é de que o evento esteja relacionado com o toque na região ventral e pressão sobre órgãos reprodutivos. Provavelmente esse tipo de massagem mimetize a pressão da fêmea sobre o ventre do macho, mas como não há fêmea durante a colheita, o movimento deste órgão copulatório ocorreria de forma involuntária.

Em relação às características macroscópicas do sêmen avaliado, a maioria apresentou formação de grumos, apesar de não terem sido identificados fatores que explicassem a ausência desses aglomerados em alguns indivíduos. Sobre a coagulação de parte da amostra do indivíduo M4, Wourms (1977) declarou que o conteúdo das glândulas do cláspere de raias marinhas coagula em contato com a água salgada. Apesar de termos avaliado um animal de água doce, é possível que essas glândulas também estejam envolvida no processo de coagulação e formação de plug.

Uma série de autores relataram a formação de aglomerados de espermatozoides em elasmobrânquios e inclusive em algumas espécies de *Potamotrygon* (MINAMIKAWA; MORISAWA, 1996; CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004; CHATCHAVALVANICH; THONGPAN; NAKAI, 2004; PEDREROS-SIERRA; RAMÍREZ-PINILLA, 2015; PENFOLD; WYFFELS, 2019). Nas fases iniciais deste projeto, observamos o sêmen fresco de *P. falkneri* sob microscopia óptica de luz e visualizamos estruturas muito semelhantes aos spermatozeugmata descritos na literatura supracitada (Figura 7). É provável que essa tendência de formação de aglomerados seja a causa da presença dos grumos das amostras obtidas neste projeto e visualizadas inclusive na avaliação macroscópica.

Quando testamos a motilidade nos diluentes resfriados e aquecidos, a temperatura não mostrou alteração estatística significativa. Apesar disso, ao observar os gráficos podemos notar que tanto o INRA quanto o Optixcell apresentaram valores outliers referentes à baixa motilidade no diluente frio. Talvez a repetição do teste com

um número amostral maior possa mostrar resultados diferentes e com valores melhor distribuídos.

Já foi relatado que o aumento da temperatura da água seria uma possível pista ambiental para retomada da espermatogênese, pois foi associado ao aumento de comportamentos reprodutivos e produção espermática em algumas espécies marinhas mantidas em aquário (DALY, 2008). É importante ressaltar que esse dado refere-se ao efeito da temperatura no organismo completo do animal e não somente no nível das células espermáticas.

É senso comum que a localização dos testículos na bolsa escrotal de mamíferos tenha grande influência na manutenção dos espermatozoides sob temperatura mais baixa que a corporal. Por outro lado, os elasmobrânquios possuem todo o sistema reprodutivo localizado dentro da cavidade celomática, o que faz com que os espermatozoides não sofram alteração de temperatura ao longo do seu trajeto pelo trato reprodutivo masculino. Além disso, é improvável que exista diferenças na temperatura corporal de machos e fêmeas de elasmobrânquios. Os peixes são ectotérmicos e mantêm sua temperatura corporal de acordo com o meio, portanto machos e fêmeas mantidos no mesmo ambiente, terão a mesma temperatura corporal.

Daly (2008), Jones et al. (2010 e Penfold e Wyffles (2019) afirmaram que o sêmen de elasmobrânquio mantém boa motilidade quando resfriado a 4 °C, mas esses autores estudaram espécies marinhas. A temperatura da água do mar é mais baixa que a temperatura dos rios da América do Sul, onde vivem os *Potamotrygon*. Talvez isso explique a presença de algumas amostras com motilidade tão abaixo do padrão nos diluentes refrigerados, apesar de a temperatura do material refrigerado (média de 12,9 °C e 20,1 °C para INRA e Optixcell, respectivamente) estar bem acima dos 4 °C.

No primeiro dia de análises, ao comparar a motilidade nos diluentes INRA e Optixcell, os valores também não mostraram diferença significativa. Ainda assim, ao visualizar o Gráfico 5, podemos notar que a motilidade no INRA teve valores muito mais próximos e padronizados, enquanto o Optixcell apresentou valores bastante dispersos. Infelizmente a concentração espermática do sêmen é muito elevada, o que impossibilita a avaliação do material fresco a fim de saber qual diluente apresenta maior semelhança com o padrão de distribuição de motilidade natural.

As curvas de motilidade ao longo dos dias foram bem semelhantes para os diluentes INRA e Optixcell. O único aspecto que chama a atenção no Gráfico 6 são valores discrepantes no D3, tanto no diluente INRA, que apresentou valores baixos para *P. motoro*, quanto no Optixcell, com valores elevados para *P. falkneri*. Não houve nenhuma alteração identificável que justificasse essas alterações, mas como ocorreram na mesma data, provavelmente trata-se de algum erro no protocolo de avaliação daquele dia.

O longo período de sobrevivência dos espermatozoides refrigerados foi um fator que chamou muita atenção neste trabalho. Pratt e Tanaka (1994) relataram que os machos armazenam espermatozoides por longos e indeterminados períodos, mas somente Jones et al. (2010) informaram o valor definido de uma semana para manutenção de boa motilidade. Não foi encontrado nenhum relato científico a respeito do período de sobrevivência total das células espermáticas em elasmobrânquios. Nossa observação da presença de espermatozoides móveis 18 dias após a colheita é inédita e acreditamos que esse período seja ainda mais longo, já que as avaliações foram interrompidas quando ainda se observava motilidade média total em torno de 17 a 22%.

No dia D2, uma lâmina que havia sido avaliada foi deixada fora da refrigeração e ainda assim, quando observada novamente no dia seguinte apresentou células vivas. O ambiente iônico e a hexose parecem ter papéis importantes na manutenção das células espermáticas dos peixes cartilagosos (MINAMIKAWA; MORISAWA, 1996), mas ainda não se exatamente quais componentes espermáticos influenciam essa durabilidade tão longa e mais estudos sobre a composição desses fluidos são necessários.

Conforme observado nos gráficos 7 e 8, não houve diferença significativa da motilidade ao longo dos dias para as espécies *P. falkneri* e *P. motoro* nos dois diluentes testados. Isso mostra que tanto o INRA quanto o Optixcell são boas opções de diluentes para avaliação da motilidade espermática para os *Potamotrygon*. Dessa forma, as duas espécies foram colocadas juntas para avaliação do sêmen congelado, o que aumentou o número amostral e a confiabilidade do teste.

Apesar de os espermatozoides estarem vivos e móveis após o descongelamento no Optixcell, este diluente não se mostrou uma boa opção como criopreservador, pois os valores pós descongelamento foram mais baixos e significativamente diferentes em relação ao sêmen avaliado antes do procedimento.

Por outro lado, além de não apresentar diferença estatística entre a motilidade pré e pós congelamento, o diluente INRA adicionado do crio preservador DMSO mostrou resultado impressionante, com aumento da motilidade pós congelamento em mais da metade dos indivíduos, chegando a mais de 200%. Esses dados mostram que a solução é uma boa opção para armazenar o sêmen durante o processo de criopreservação, mas é preciso avaliar melhor se o DMSO tem alguma influência sobre o processo de ativação dos espermatozoides.

Esses achados ressaltam a necessidade de mais estudos sobre a composição do esperma de raias de água doce. Existem alguns trabalhos relativos à constituição do sêmen em elasmobrânquios que discutem sobre a influência das mudanças iônicas na ativação dos espermatozoides (MINAMIKAWA; MORISAWA, 1996; PENFOLD; WYFFELS, 2019), mas não podemos esquecer que os trabalhos utilizando animais marinhos devem ser avaliados criteriosamente antes de serem extrapolados para os potamotrygonídeos. Um dos pontos discutidos por Minamikawa e Morisawa (1996) é como as altas concentrações de ureia no plasma influenciariam a composição dos fluidos corporais de elasmobrânquios marinhos, o que é irrelevante para os *Potamotrygon* que eliminaram completamente a necessidade deste composto em seu metabolismo (BALLANTYNE; ROBINSON, 2010).

A avaliação da motilidade espermática em um potamotrygonídeo e sua interação com diferentes fluidos foi muito bem explorada no trabalho de Dzyuba et al. (2019). Eles utilizaram amostras provenientes de animais eutanasiados e suas descobertas são muito relevantes para a compreensão da composição dos fluidos seminais antes do momento da ejaculação. Porém eles não consideraram um fator que pode exercer grande interferência: a água.

É consenso na literatura que os elasmobrânquios possuem fertilização interna, mas poucos autores realmente discutem sobre a teoria de que a transferência dos espermatozoides do macho para a fêmea durante a cópula envolveria o uso de água para ajudar a bombear o sêmen para dentro dos ovidutos (WOURMS, 1977; MINAMIKAWA; MORISAWA, 1996; CARRIER; PRATT JR.; CASTRO, 2004; MCEACHRAN; ASCHLIMAN, 2004). Carrier, Pratt Jr. e Castro (2004) citaram que os espermatozoides podem formar aglomerados como forma de proteção contra perdas durante contato com água durante a cópula e essa teoria faz sentido se a água funcionar apenas como um carreadora do material. Porém, se levarmos em conta que essa água pode funcionar também como ativador dos espermatozoides, então a

formação desses aglomerados poderia dificultar o contato direto da água com o maior número de células espermáticas. Lembrando que a água também já foi citada como coaguladora do conteúdo da glândula do cláster (WOURMS, 1977) para possível formação de plug, é plausível que o ejaculado de elasmobrânquios possua diferentes fases com distintas concentrações de cada um dos seus componentes, incluindo a água.

Ballantyne e Robinson (2010) apontam para o fato de que um ciclo de vida completo em água doce exigiria a capacidade do esperma para sobreviver e ser ativado em água doce. Nas fases iniciais deste projeto, tentamos adicionar ao sêmen água doce potável e decolorada, mas isso resultou na morte imediata dos espermatozoides. Por outro lado, não tentamos utilizar a própria água do tanque no qual o animal era mantido. Posteriormente, o MV. MSc. Pedro Nacib Jorge Neto relatou que visualizou considerável aumento da motilidade espermática ao adicionar água salgada do tanque ao sêmen colhido de raias marinhas (comunicação pessoal).

Após estas reflexões, devemos ter em mente que apesar de os elasmobrânquios apresentarem fecundação interna, é indispensável que o estudo sobre a reprodução destes animais considere também características da água, que até o momento são julgadas apenas em estudos com animais de fecundação externa (COSSON et al., 2008). Essas características não se referem somente à composição iônica e química, mas também à presença de supostos contaminantes como urina, fezes e restos de alimento, além de hormônios e demais sinais químicos provenientes de todos os indivíduos mantidos no recinto.

Se a água do tanque com todas essas características realmente tem papel na ativação dos espermatozoides, é muito importante que o sêmen colhido com fins de inseminação artificial ou criopreservação não entre em contato com ela de forma alguma antes do momento real da inseminação. Cosson et al. (2008) recomendam que o sêmen extraído através de massagem seja colhido direto do poro urogenital para evitar contaminação do esperma com urina, fezes e contaminantes do meio como água. Em nosso trabalho tomamos o cuidado de secar a região da cloaca com papel absorvente e a qualquer sinal de eliminação de fezes, o tubo coletor era afastado para que não entrasse em contato com o material contaminante. Quando havia evidente eliminação de urina, caracterizada pela consistência líquida que contrasta com a consistência viscosa do sêmen, a colheita também era interrompida. Porém,

pequenas quantidades de urina misturadas ao sêmen não puderam ser notadas e evitadas pela colheita a partir da cloaca.

Outro aspecto que tivemos extremo cuidado ao avaliar a motilidade foi utilizar uma lâmina do tipo câmara de contagem. Apesar das lâminas desse tipo serem padronizadas com altura de 20 microns, os espermatozoides dos *Potamotrygon* se mostraram muito delgados, se posicionando em discretos, mas diferentes níveis de foco que poderiam ser evitados com uso de uma câmara mais fina. Ainda assim, isso não interferiu na leitura do equipamento IVOS II para avaliação computadorizada e ainda garantiu a livre movimentação dos espermatozoides, sem interferências mecânicas externas que pudessem alterar a motilidade.

Os raros trabalhos da literatura que avaliaram quantitativamente a motilidade espermática de elasmobrânquios não mostraram esse cuidado. Daly (2008) fez avaliação visual do material, o que abre margem para vieses inestimáveis sobre o resultado, como variações do observador. Além disso utilizou lamínulas que pressionam o material depositado sobre a lâmina por ação do seu peso, comprometendo a livre movimentação dos espermatozoides. Dzyuba et al. (2019) utilizaram sistema computadorizado (CASA) para estudar a motilidade em *Potamotrygon*, mas infelizmente não descreveram em detalhes como realizaram o preparo do material para a avaliação.

Uma questão que ainda precisaria ser avaliada em nosso projeto é se o período do ano teria influência sobre as características espermáticas. Como os recintos dos animais estão localizados em um ambiente fechado e mantidos sob condições constantes de luminosidade e controle da água, acreditamos que o período do ano não interfira na reprodução. Mesmo assim seria interessante avaliar a qualidade espermática dos animais ao longo de pelo menos um ano, para ter certeza de que o metabolismo reprodutivo das raias de água doce não sofra interferência de nenhuma forma de reostase programada.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir deste projeto de pesquisa permitiram concluir que a literatura a respeito da colheita e avaliação espermática em *Potamotrygon* ainda é escassa. Isso ressalta a importância de estudos realizados em parceria com instituições que mantêm estes animais sob cuidados humanos e a replicabilidade desses experimentos com diferentes indivíduos e espécies.

Não foram encontradas diferenças significativas entre *P. falkneri* e *P. motoro* em relação à motilidade espermática, mas deve-se considerar a possibilidade de realizar novas avaliações em um número maior de indivíduos.

Por outro lado, foi possível encontrar diferenças relevantes entre os diluentes INRA + DMSO e Optixcell usados para criopreservação, de forma que os excelentes valores de motilidade pós descongelação com uso de INRA + DMSO sugerem que este diluente tenha algum tipo de efeito sobre a capacitação espermática de potamotrygonídeos.

REFERÊNCIAS

- ANAYA-LÓPEZ, P.; RAMÍREZ-PINILLA, M. P. Clasper gland morphology and development in *Potamotrygon magdalenae* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). **Journal of Morphology**, v. 278, p. 369–379, 2017.
- ARAÚJO, M. et al. Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and challenges. **Information document AC 20**, v. Info 08, p. 1–6, 2004.
- BALLANTYNE, J. S.; ROBINSON, J. W. Freshwater elasmobranchs: a review of their physiology and biochemistry. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 180, p. 475–493, 2010.
- CARRIER, J. C.; PRATT JR., H. L.; CASTRO, J. I. Reproductive Biology of Elasmobranchs. In: CARRIER, J. C.; MUSICK, J. A.; HEITHAUS, M. R. (Ed.). **Biology of Sharks and Their Relatives**. [s.l.] CRC Press, 2004. p. 596.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; DE ARAÚJO, M. L. G.; DE ALMEIDA, M. P. Reproductive Aspects of Freshwater Stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. **Journal of Northwest Atlantic Fishery Science**, v. 35, p. 165–171, 2005.
- CHATCHAVALVANICH, K.; THONGPAN, A.; NAKAI, M. Structure of the testis and genital duct of freshwater stingray, *Himantura signifer* (Elasmobranchii: Myliobatiformes: Dasyatidae). **Ichthyological Research**, v. 52, p. 123–131, 2004.
- CHATCHAVALVANICH, K.; THONGPAN, A.; NAKAI, M. Ultrastructure of spermiogenesis in a freshwater stingray, *Himantura signifer*. **Ichthyological Research**, v. 52, p. 379–385, 2005.
- CLARK, E.; VON SCHMIDT, K. Sharks of the Central Gulf Coast of Florida. **Bulletin of Marine Science**, v. 15, p. 13–83, 1965.
- COLBACHINI, H. et al. A new report on the clasper movements of a captive Sand Tiger Shark *Carcharias taurus* (Lamniformes: Odontaspidae) and a possible reason for the behaviour. **Journal of Threatened Taxa**, v. 10, n. 11, p. 12577–12581, 2018.
- COSSON, J. et al. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, p. 460–486, 2008.
- DALY, J. et al. Ultrasound examination and behavior scoring of captive broadnose sevengill sharks, *Notorynchus cepedianus* (Peron, 1807). **Zoo Biology**, v. 26, p. 383–395, 2007.
- DALY, J. **Development of Assisted Reproductive Technologies in Captive Fish**. 2008. Monash University, 2008.
- DALY, J.; JONES, R. The use of reproductive technologies in breeding programs for elasmobranchs in aquaria. In: SMITH, M. et al. (Ed.). **The Elasmobranch Husbandry Manual II: Recent Advances in the Care of Sharks, Rays and their Relatives**. 2. ed. Columbus: Ohio Biological Survey, 2017. p. 363–374.

DE CARVALHO, M. R. Description of two extraordinary new species of freshwater Stingrays of the genus *Potamotrygon* endemic to the Rio Tapajós Basin, Brazil (Chondrichthyes: Potamotrygonidae), with notes on other Tapajós Stingrays. **Zootaxa**, v. 4167, n. 1, p. 1–63, 2016.

DE MORAES, J. E. et al. A histology-based study in apparently healthy wild freshwater stingrays *Potamotrygon motoro*. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, n. 1, p. 165–168, 2016.

DE MOREIRA, R. A.; LOBODA, T. S.; DE CARVALHO, M. R. Comparative anatomy of the clasper of the subfamily Potamotrygoninae (Chondrichthyes: Myliobatiformes). **Journal of Morphology**, v. 279, n. 5, p. 598–608, 2018.

DÍAZ, J. et al. First DNA Barcode Reference Library for the Identification of South American Freshwater Fish from the Lower Paraná River. **Plos One**, p. 1–20, 2016.

DUNCAN, W. P. et al. Biologia e história natural de *Potamotrygon wallacei* (Carvalho, Rosa e Araújo, 2016) na bacia do rio Negro, Amazônia Central, Brasil. In: LASSO, C. A. et al. (Ed.). **XV. Rayas de Agua Dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica**. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2016. p. 435.

DZYUBA, V. et al. Sperm motility in ocellate river stingrays: evidence for post-testicular sperm maturation and capacitation in Chondrichthyes. **Journal of Zoology**, v. 307, p. 9–16, 2019.

GARRONE NETO, D. Considerações sobre a reprodução de duas espécies de raias (Myliobatiformes, Potamotrygonidae) na região do Alto Rio Paraná, Sudeste do Brasil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 5, n. 1, p. 101–111, 2010.

GARRONE NETO, D.; HADDAD JUNIOR, V. Stingrays in rivers in southeastern Brazil: Occurrence localities and impact on the population. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 82–88, 2010.

GARRONE NETO, D.; UIEDA, V. S. Activity and habitat use of two species of stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) in the upper Paraná River basin, Southeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 1, p. 81–88, 2012.

GÓES DE ARAÚJO, M. L. **Potamotrygon falkneri, Reticulated Freshwater Stingray**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009-2.RLTS.T161353A5404947.en>>. Acesso em: 12 jul. 2019.

INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM. **Potamotrygon Garman, 1877**. Disponível em: <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=161005#null>. Acesso em: 31 jan. 2021.

JONES, R. et al. Assisted Reproduction Techniques (ART) in Captive Elasmobranchs. In: 41st Annual Conference of the International Association for Aquatic Animal Medicine, Vancouver. **Anais...** Vancouver: International Association for Aquatic Animal Medicine, 2010. Disponível em: <<https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?pId=11307&id=4473884>>.

KESCHUMRAS, N. **Evaluation and preservation of the Ocellate River Stingray (Potamotrygon motoro) semen**. 2014. Chulalongkorn University, 2014.

LYONS, K. et al. Who's My Daddy? Considerations for the influence of sexual selection on multiple paternity in elasmobranch mating systems. **Ecology and Evolution**, v. 7, n. 15, p. 5603–5612, 2017.

MCEACHRAN, J. D.; ASCHLIMAN, N. Phylogeny of Batoidea. In: CARRIER, J. C.; MUSICK, J. A.; HEITHAUS, M. R. (Ed.). **Biology of Sharks and Their Relatives**. [s.l.] CRC Press, 2004. p. 596.

MINAMIKAWA, S.; MORISAWA, M. Acquisition, initiation and maintenance of sperm motility in the shark, *Triakis scyllia*. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology**, v. 113, n. 4, p. 387–392, 1996.

MORALES-GAMBA, R. D. et al. Sperm characterization of the Amazonian freshwater cururu stingray *Potamotrygon wallacei* (Potamotrygonidae): Basic knowledge for reproduction and conservation plans. **Zygote**, v. 27, n. 4, p. 259–261, 2019.

PADILHA, F. L. A. et al. Validation of manual semen collection methods and sperm evaluation in living freshwater stingrays (*Potamotrygon falkneri*) kept in ex situ conditions. **Environmental Biology of Fishes**, v. 104, n. 4, p. 463–469, 2021.

PEDREROS-SIERRA, T. D. M.; RAMÍREZ-PINILLA, M. P. Morphology of the Reproductive Tract and Acquisition of Sexual Maturity in Males of *Potamotrygon magdalenae* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). **Journal of Morphology**, v. 276, p. 273–289, 2015.

PENFOLD, L. M.; WYFFELS, J. T. Reproductive Science in Sharks and Rays. In: COMIZZOLI, P.; BROWN, J. L.; HOLT, W. V. (Ed.). **Reproductive Sciences in Animal Conservation**. 2nd. ed. Cham: Springer, 2019. p. 465–488.

PRATT, H. L.; TANAKA, S. Sperm storage in male elasmobranchs: A description and survey. **Journal of Morphology**, v. 219, p. 297–308, 1994.

PRATT JR., H. L. Elasmobranch Gonad Structure: A Description and Survey. **Copeia**, v. 1988, n. 3, p. 719–729, 1988.

REYNOLDS, J. et al. Husbandry of freshwater stingrays. In: SMITH, M. et al. (Ed.). **The Elasmobranch Husbandry Manual II: Recent Advances in the Care of Sharks, Rays and their Relatives**. 2. ed. Columbus: Ohio Biological Survey, 2017. p. 99–112.

RINCON FILHO, G. **Aspectos taxonômicos, alimentação e reprodução da raia de água doce *Potamotrygon orbignyi* Castenlau (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) no rio Paranã-Tocantins**. 2006. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2006.

ROSA, R. de S. **A systematic revision of the south american freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae)**. 1985. The College of William and Mary in Virginia, 1985.

SEBBEN, A. et al. **Atlas de anatomia comparada de vertebrados: sistema**

urogenital. Brasília: Universidade de Brasília, 2019.

SILVA, A. G. C. da; GOULART, E. Morfometria de raias continentais (Chondrichthyes, Potamotrygonidae) do alto rio Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 29, n. 4, p. 413–419, 21 fev. 2007.

SILVA, J. P. C. B. da; CARVALHO, M. R. A taxonomic and morphological redescription of *Potamotrygon falkneri* Castex & Maciel, 1963 (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 1, p. 209–232, 2011.

STANLEY, H. P. Fine Structure of Spermiogenesis in the Elasmobranch Fish *Squalus suckleyi*. **Journal of Ultrastructure Research**, n. 36, p. 103–118, 1971.

TANAKA, S.; KUROKAWA, H.; HARA, M. Comparative morphology of the sperm in chondrichthyan fishes. In: JAMIESON, B. G. M.; AUSIO, J.; JUSTINE, L. (Ed.). **Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy**. Paris, FR: Mémoires du Muséum National d'Histoire naturelle, 1995. p. 313–320.

TANIUCHI, T.; ISHIHARA, H. Anatomical Comparison of Claspers of Freshwater Stingrays (Dasyatidae and Potamotrygonidae). **Japanese Journal of Ichthyology**, v. 37, n. 1, p. 10–16, 1990.

THORSON, T. B. Freshwater stingrays, *Potamotrygon* spp.: failure to concentrate urea when exposed to saline medium. **Life Sciences**, v. 9, n. 2, p. 893–900, 1970.

THORSON, T. B.; LANGHAMMER, J. K.; OETINGER, M. I. Reproduction and development of the South American freshwater stingrays, *Potamotrygon circularis* and *P. motoro*. **Environmental Biology of Fishes**, v. 9, n. 1, p. 3–24, 1983.

WOURMS, J. P. Reproduction and Development in Chondrichthyan Fishes. **American Zoologist**, v. 17, n. 2, p. 379–410, 1977.

ZAIDEN, S. F. et al. Testicular structure and spermatogenesis of Amazonian freshwater cururu stingray *Potamotrygon* cf. *histrrix*. **Zygote**, v. 19, p. 245–253, 2010.

APÊNDICE A – Configurações padronizadas (Setup) para leitura do sêmen de Potamotrygon pelo Sistema CASA no equipamento IVOS II

(Setup)	
(Name)	Stingray IVOS2 210319
Analysis Limits	
Min Motility Percent	0
Min Progressive Percent	0
Min Total Count	200
Calibration	
Objective	8: Zeiss 10x NH IVOS-II 160mm
Objective Magnification X	1,2
Objective Magnification Y	1,2
Camera	
Exposure (Ms)	16
Gain	300
Integrate Enabled	False
Integrate Time (Ms)	500
Cell Detection	
Elongation Max (%)	50
Elongation Min (%)	1
Enable Advanced Tail Detection	False
Head Brightness Min	110
Head Size Max (μm^2)	80
Head Size Min (μm^2)	5
Static Tail Filter	False
Tail Brightness Min	84
Tail Min Brightness Auto Offset	5
Tail Min Brightness Mode	Manual
Chamber	
Capillary Correction	1,3
Chamber Depth (μm)	20,49
Chamber Type	Capillary
Illumination	
Contains Auto Illum Calibration	False
Histogram Smooth Width	0
Illumination Primary	LED - Red
Max Photometer	70
Min Photometer	60
Kinematics	
Cell Travel Max (μm)	15
Enable Motile Static Collision Avoidance	False
Motile cells require a tail	False
Motile Require Tails Max VSL ($\mu\text{m}/\text{s}$)	0
Progressive STR (%)	75
Progressive VAP ($\mu\text{m}/\text{s}$)	50
Slow VAP ($\mu\text{m}/\text{s}$)	50
Slow VSL ($\mu\text{m}/\text{s}$)	30
Static Algorithm	Width_Multiplier
Static VAP ($\mu\text{m}/\text{s}$)	10
Static VSL ($\mu\text{m}/\text{s}$)	0
Static Width Multiplier	0,5
Morph	
DMR Confidence (%)	20
DMR Droplet to tail end Max (μm)	5
DMR Tail Length Max (μm)	15
Droplet Confidence (%)	80
Droplet Distal Distance Min (μm)	4
Droplet Proximal Head Length (μm)	0
Min Tail Length (μm)	4
Morph Normal Minimum Percentage	0
Tail Bend Angle Averaging Length (μm)	5
Tail Bending Angle Rate Min ($^\circ/\mu\text{m}$)	20
Tail Bent Confidence (%)	75
Tail Coiled Angle Min ($^\circ$)	180
Tail Coiled Confidence (%)	80
Tail Confidence (%)	75
Stage	
Stage Temp (C)	37
Viadent Category	
Viadent Fluorescing Sperm	NonViable
Video Capture	
Frame Capture Speed (Hz)	60
Frame Count	45