

FABIANA LÚCIA ANDRÉ PADILHA

**Validação de métodos de colheita e avaliação espermática em raias  
do gênero *Potamotrygon***

São Paulo

2020

FABIANA LÚCIA ANDRÉ PADILHA

**Validação de métodos de colheita e avaliação espermática em 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Schilbach Pizzutto

De acordo: \_\_\_\_\_

Orientador

São Paulo  
20XX

**Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP**

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. 3912  
FMVZ

Padilha, Fabiana Lúcia André  
Validação de métodos de colheita e avaliação espermática em raios do gênero  
*Potamotrygon* / Fabiana Lúcia André Padilha. – 2020.  
65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Schilbach Pizzutto.

1. Elasmobrânquios. 2. Reprodução. 3. Sêmen. 4. *Potamotrygon falkneri*. I. Título.

# Certificado da Comissão de Ética



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Validação de métodos de colheita e avaliação espermática em raiado gênero *Potamotrygon*", protocolada sob o CEUA nº 5200300919 (10.007260), sob a responsabilidade de **Cristiane Schilbach Pizzutto** e equipe; **Fabiana Lucia André Padilha** - 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 04/12/2019.

We certify that the proposal "Validation of semen collection methods and sperm evaluation in rays of the genus *Potamotrygon*", utilizing 8 Fishes (8 males), protocol number CEUA 5200300919 (10.007260), under the responsibility of **Cristiane Schilbach Pizzutto** and team; **Fabiana Lucia André Padilha** - 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 12/04/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **12/2019** a **02/2020** Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Peixes**

sexo: **Machos**

idade: **1 a 4 anos**

N: **8**

Linhagem: **Potamotrygon**

Peso: **800 a 3000 g**

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

São Paulo, 23 de janeiro de 2020

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-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PADILHA, Fabiana Lúcia André

Título: **Validação de métodos de colheita e avaliação espermática em 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 este trabalho a todos os animais que pude conhecer e tive a oportuna felicidade de apreender e trabalhar com todos eles.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao meu Nego, pelo nosso conto de “fadas”, de companheirismo, acreditar em mim, incentivo, apoio, compreensão, debates e conversas longas sobre todos os assuntos, por me ensinar a entender a importância dos insetos e me deixar contemplar um voo de passarinho e a pata de um bugio em qualquer lugar impossível às vezes de imaginar, por me ensinar a ver a vida mais leve, por sempre ter um riso fácil disponível para mim e por ser meu fã, te amo!

Agradeço à minha primeira família, meus irmãos, tia Terezinha, meus sogros, cunhadas e cunhado, pelo carinho, apoio, conselhos e por todo amor, afinal mesmo na nossa loucura somos uma família.

Agradeço aos meus amigos que são uma família para mim, afinal família é um grupo de espíritos afins que se escolhem e formam uma família.

Agradeço também à minha outra família, a do Aquário de São Paulo; não tenho palavras para expressar tudo o que sinto e como costumamos dizer: cada dia vivido no ASP é uma vida.

Um agradecimento especial a algumas pessoas que o Aquário me deu de presente para a vida, amigos que posso contar e que moram no meu coração, me acompanhando nesta longa jornada, não citarei nomes para não dizer que falei de um e não do outro.

Agradeço à equipe dos Mamíferos Terrestres, que por diversas vezes me ajudou segurando as pontas, para esta etapa da minha vida.

Agradeço aos meninos do Aquarismo pelo manejo com as raias, Carlão manutenção da bateria, Rafa e Arthur pelas contenções e na biometria também.

Agradeço à FMVZ, ao VRA e em especial ao laboratório de Andrologia, meu obrigada ao Profº Marcílio pela confiança, a Roberta Leite (Bobbie) pelo

ensinamento e carinho, ao Diego pelas conversas explicativas, à Rafa pelas explicações e todos pela paciência comigo.

Agradeço à Sofia pelo companheirismo nesta caminhada e compartilhar comigo o projeto e anseios.

E minha eterna gratidão à Cris, minha orientadora e amiga, por acreditar em mim e por segurar firme do meu lado todas as barras que passamos, ao me ensinar a cada dia como ser uma supermãe, esposa e ao mesmo tempo profissional e por me fazer acreditar na pesquisa e na minha capacidade, mais uma vez me faltam palavras.

Agradeço às ariranhas e às lontras, por me ensinarem tanto; tenho um enorme fascínio pela família mustelídeos, alí adiante estudo mais sobre vocês.

E por fim, as raias, agradeço por concluir esta etapa da minha vida com vocês e me ensinaram de como a vida pode nos surpreender e que este mundo dá voltas.

E não posso de deixar de agradecer a Deus pela oportunidade de viver a vida como deve ser vivida e por sempre manter em mim a esperança acesa.

Um agradecimento à CAPES, pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço a minha mãe Dona Maria, que mesmo das formas mais singelas e da montanha russa que é a vida, me ensinou a ser o que sou hoje e a sempre ter força para seguir meus sonhos e objetivos.

Obrigada! Amo a senhora!

*“Não se percebeu ainda que o instinto serve melhor aos animais do que a razão serve ao homem.” (José Saramago )*

## RESUMO

PADILHA, F. L. A. **Validação de métodos de colheita e avaliação espermática em raias do gênero *Potamotrygon***. 2020. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

As raias da família Potamotrygonidae vivem exclusivamente na água doce, estão distribuídas em diversas bacias hidrográficas da América do Sul. A agressão sofrida pelo meio ambiente nos últimos anos, em especial os ambientes aquáticos, vem afetando diretamente as populações de espécies nativas de peixes. Devido a ação antrópica, algumas espécies do gênero *Potamotrygon* encontram-se ameaçadas de extinção, razão esta que nos motiva a realizar estudos que envolvam o conhecimento da reprodução em *ex situ*. Utilizou-se seis exemplares machos, adultos de *Potamotrygon falkneri*, mantidos sob os cuidados do Aquário de São Paulo, Brasil. Os animais foram divididos em dois grupos que se alternaram, com intervalo de 50 dias, para a realização de dois protocolos de colheita de sêmen distintos: por meio de contenção física (rede de contenção) e química (3mg/kg de propofol diretamente nas brânquias). Após o posicionamento do animal em espuma umedecida, com a parte ventral para cima, foi realizada uma massagem manual na região das ampolas dos ductos deferentes. Um tubo coletor foi posicionado na abertura da cloaca para a colheita do sêmen. A avaliação espermática foi realizada em tempo 0 e após 5 horas no Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), além dos testes de integridade de membrana e atividade citoquímica mitocondrial. Os parâmetros avaliados para contenção física e química foram volume (4.76 mL  $\pm$  0.95 vs. 3.41 mL  $\pm$  0.95), concentração (929.50 spz x 10<sup>6</sup>/mL  $\pm$  70.97 vs. 1,071.67 spz x 10<sup>6</sup>/mL  $\pm$  108.82), vigor (0-5 scale; 2.34  $\pm$  0.17 vs. 2.83  $\pm$  0.16), motilidade total no tempo 0, logo após a colheita (57.50%  $\pm$  6.55 vs. 62.50%  $\pm$  5.28). Após 5 horas de colheita o resultado foi para motilidade total 51.83%  $\pm$  7.12 vs. 53.67%  $\pm$  6.12; motilidade progressiva 13.67%  $\pm$  1.71 vs. 10.67%  $\pm$  1.12, células rápidas 25.17%  $\pm$  2.68 vs. 25.17%  $\pm$  2.68 e células estáticas 28.17%  $\pm$  4.41 vs. 24.84%  $\pm$  5.58. Não houve diferença estatística entre as formas de contenção para qualquer parâmetro avaliado. Os testes de viabilidade de membrana se mostraram eficiente, pois houve uma progressão linear com valor de P < 0,0001. Estes resultados permitem concluir

que a massagem manual é um método efetivo de colheita de sêmen em raias e devida a similaridade de informações encontradas na avaliação espermática entre os dois protocolos testados, a contenção física pode ser um método de eleição, visto que é de manejo mais rápido e isenta o animal do risco da anestesia. Sendo assim, estas informações são de extrema relevância para futuras biotécnicas reprodutivas que possam ser desenvolvidas com *Potamotrygon*.

Palavras-chave: Elasmobrânquios; Reprodução; Sêmen; *Potamotrygon falkneri*.

## ABSTRACT

PADILHA, F. L. A. **Validation of collection methods and sperm evaluation in rays of the genus *Potamotrygon***. 2020. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The *Potamotrygon* of the *Potamotrygonidae* family is a freshwater stingray, native to, and distributed throughout the South American watersheds. The aggression suffered by the environment in recent years, in special aquatic environments, directly affects native fish species. Due to anthropic actions, some species of the genus *Potamotrygon* are threatened with extinction, encouraging a study on captive breeding procedures. For this purpose, six *Potamotrygon falkneri* adult males, kept under the care of the São Paulo Aquarium, Brazil, were divided into groups to compare two distinct semen collection protocols: PR - physical restraint (net), and CR - chemical restraint (3mg / kg propofol, directly into the gills). The protocols were alternated between the two groups in a 50-day interval. After positioning the animal on a moistened foam in dorsal recumbency, semen collection was performed by placing a collecting tube at the cloaca opening, while performing a gentle massage of the vas deferens. Sperm evaluation was performed at the moment of the collection (time 0) and 5 hours post-collection using computer-assisted sperm analysis (CASA), in addition to the tests of membrane integrity and mitochondrial cytochemical activity. Parameters evaluated (presented in mean  $\pm$  standard error of the mean) were: volume (in mL; PR:  $4.76 \pm 0.95$ ; CR:  $3.41 \pm 0.95$ ); concentration (in  $10^6$ /mL; PR:  $929.50 \pm 70.97$ ; CR:  $1.071.67 \pm 108.82$ ); vigor (scale 0 to 5; PR:  $2.34 \pm 0.17$ ; CR:  $2.83 \pm 0.16$ ); total motility at time 0 (in %; PR:  $57.50 \pm 6.55$ ; CR:  $62.50\% \pm 5.28$ ); total motility ( $51.83\% \pm 7.12$  vs.  $53.67\% \pm 6.12$ ) and progressive motility (in %; PR:  $13.67 \pm 1.71$ ; CR:  $10.67 \pm 1.12$ ) after five hours. There was no statistical difference between the forms of restraints examined for any parameter evaluated. For the membrane viability tests, they proved to be efficient because there was a linear progression with a value of  $P < 0.0001$  for both. The results suggest that physical restraint and manual massage is an effective method of harvesting semen in stingrays and should be considered the first choice of management, as it not only demonstrated to be a faster procedure but more importantly, eliminated anesthetic-

associated risks for the animal. Thus, this information is considered extremely relevant for the development of future reproductive biotechniques with *Potamotrygon*.

Keywords: Elasmobranch; Reproduction, Semen; *Potamotrygon falkneri*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Panorama geral de Políticas Públicas para a conservação de raias de água doce</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>História Natural da <i>Potamotrygon falkneri</i></b> .....	<b>20</b>
<b>2.2.1</b>	Aspectos Reprodutivos .....	<b>23</b>
<b>2.2.2</b>	Aspectos Morfológicos dos Machos .....	<b>24</b>
<b>2.2.3</b>	Espermatogênese em Elasmobrânquios .....	<b>27</b>
<b>2.2.4</b>	Morfologia do espermatozoide.....	<b>28</b>
<b>2.3</b>	<b>Avaliação Espermática</b> .....	<b>30</b>
<b>2.4</b>	<b>Métodos de Contenção Animal</b> .....	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Dentro do ambiente aquático, são encontradas espécies de elasmobrânquios que vão desde as partes mais profundas dos oceanos e nos taludes continentais, até águas superficiais oceânicas ou rasas e costeiras. A grande maioria dos elasmobrânquios está restrita a ambientes marinhos. Porém, algumas espécies têm capacidade de tolerar ambientes de água doce ou estuarinos com águas salobras, e, até mesmo, há a ocorrência da família de raias Potamotrygonidae, endêmica da América do Sul, exclusiva de ambientes dulcícolas (AGUIAR; VALENTIN, 2010).

As raias de água doce possuem a seguinte classificação: Classe Chondrichthyes, Subclasse Elasmobranchii, Ordem Myliobatiformes (raias-com-ferrão) representada por 08 famílias (VALENTIM, 2011). A família Potamotrygonidae é encontrada apenas na América do Sul sendo a única família viva de elasmobrânquios totalmente restrita à água doce. Atualmente, a família contém quatro gêneros: Potamotrygon; Paratrygon; Plesiotrygon e Heliotrygon (REYNOLDS; HORNBROOK; STETTNER, 2017).

A família Potamotrygonidae compreende um grupo de condrictes que possui adaptações para a vida exclusiva em água doce (LOBODA; CARVALHO, 2013). As raias de água doce são distintas das marinhas, por apresentarem além de especializações morfológicas e fisiológicas, a pélvis com um processo anteromediano bem desenvolvido e baixa concentração de ureia no sangue e fluidos corporais (VALENTIM, 2011). Os potamotrigonídeos ocupam uma série de *habitats*, incluindo a calha de grandes rios, praias, igapós, riachos com fundo argiloso ou pedregoso e lagos. Apresenta um auto policromatismo, são vivíparas e carnívoras (LOBODA; CARVALHO, 2013).

A *Potamotrygon falkneri* é uma espécie da família Potamotrygonidae, endêmica da Bacia Paraná-Paraguai, ocorrendo no Brasil, Argentina e Paraguai (GARRONE NETO, 2010). Caracterizada principalmente por apresentar coloração dorsal do disco marrom escuro, com manchas claras ou laranja circular, oval, vermicular e/ou rosetas. Os pontos são geralmente iguais ou menores que os diâmetros dos olhos; barbatanas pélvicas estão localizadas dorsalmente com o mesmo padrão do disco e apresentam de uma a três linhas de espinhos irregulares na porção anterior da cauda, de acordo com a figura 1 e 2 (LASSO et al., 2016).

Embora não esteja ainda esclarecido, o policromatismo pode ser atribuído aos diferentes tipos de água em que esses peixes se encontram (VALENTIM, 2011).

Figura 1 e 2: Padrão de coloração *P. falkneri*. São Paulo, 2020.



Fonte: Foto cedida por Danilo Cardoso.

Pesquisas envolvendo a reprodução de raias se intensificaram nas últimas décadas, mas ainda o número de trabalhos publicados é inferior quando comparado à produção científica relacionada aos tubarões. Boa parte desses estudos trata de espécies marinhas e, com exceção de algumas dissertações e teses (ARAÚJO 1998; CHARVET-ALMEIDA 2001; GARRONE NETO, 2009).

Estudos sobre morfologia espermática nos fornecem conhecimento para identificar possíveis associações entre morfologia espermática e biologia reprodutiva, fertilidade, bem como implicações filogenéticas (ALAVI et al., 2012).

Com o objetivo de manter e maximizar a variabilidade genética das populações de peixes ameaçados, as técnicas de reprodução assistida podem ser utilizadas como ferramentas auxiliares para a conservação. Uma primeira etapa básica e essencial para a aplicação de biotécnicas da reprodução é a colheita, avaliação, o armazenamento do sêmen para a conservação de espermatozoides por longos períodos (MARIA; AZEVEDO; CARNEIRO, 2009; MOREIRA; LOBODA; CARVALHO, 2018).

Desta forma, a evolução da degradação ambiental dos corpos d'água, a sobrepesca, o declínio das espécies, construção de barragens e reservatórios, entre outros problemas ambientais, o presente estudo se faz necessário, uma vez que o conhecimento da bioecologia de raias de águas doce ainda é escasso e incipiente (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2011). Sendo assim, o tema principal do trabalho gira em torno da hipótese de que é possível trabalhar informações básicas sobre a

reprodução de raias de água doce, como subsídios para o futuro emprego de biotécnicas reprodutivas.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

Elasmobrânquios estão entre os animais mais ameaçados do mundo, com declínios populacionais de até 90% reportados em diversas partes do planeta (DENT; CLARKE, 2015). Estima-se que cerca de 25% das espécies atualmente descritas estão enfrentando algum nível de ameaça conforme citado por Dulvy et al., 2014.

O gênero *Potamotrygon* contém espécies que são as mais mantidas em aquários (REYNOLDS; HORN BROOK; STETTNER, 2017). A agressão sofrida pelo meio ambiente, em especial os ambientes aquáticos, vem afetando diretamente as populações de espécies nativas de peixes. Mesmo antes de uma espécie de peixe entrar para a lista daquelas ameaçadas de extinção, muitas de suas características genéticas originais podem ter sido modificadas visando a sua adaptação ao ambiente alterado. Com o passar de algumas poucas gerações, algumas características genéticas podem até serem perdidas (MARIA; AZEVEDO; CARNEIRO, 2009).

Nas últimas décadas, a exportação de raias de água doce tem movimentado um mercado cada vez maior. O interesse dos aquaristas e a situação econômica dos países importadores determinam a demanda das espécies e dirigem o esforço de pesca no Amazonas (VALENTIM, 2011).

### **2.1 Panorama geral de Políticas Públicas para a conservação de raias de água doce.**

Considerando os dados de captura ornamental disponíveis, em 2015, mil exemplares de *Potamotrygon henlei* foram retiradas da natureza na bacia Tocantins/Araguaia. O mesmo ocorreu com *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon orbignyi*. Além das quotas ornamentais, as raias são capturadas incidentalmente e mortas por pescadores que temem manuseá-las vivas na rede ou por roubarem os peixes (WOSNICK et al., 2019).

A Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Selvagens Ameaçadas de Extinção (CITES) recebeu no ano de 2013 a proposta para inclusão no Anexo II, as espécies *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon motoro* e a *Potamotrygon schroederi*. Todas as propostas foram rejeitadas com base no comércio e dados insuficientes do *status* da população (REYNOLDS; HORNBROOK; STETTNER, 2017). No tocante, em 2017 o gênero foi listado no Anexo III de forma genérica como *Potamotrygon sp.*; vale ressaltar que neste anexo estão espécies para as quais um país pede às outras partes, ajuda na sua proteção, no qual o próprio Brasil se inclui.

As listas vermelhas de espécies ameaçadas de extinção constituem importante ferramenta de planejamento e alerta da opinião pública, contribuindo para a definição e priorização de estratégias de conservação e no planejamento de políticas públicas e privadas de ocupação do solo, criação de unidades de conservação e diversas outras ações de conservação (GASTAL, 2002).

As listas de espécies ameaçadas são, inquestionavelmente, a base das iniciativas para proteger espécies, seja em escala local, regional ou global. As políticas municipais, estaduais e federais sobre uso e ocupação da terra devem levar em consideração a presença de espécies ameaçadas. As listas constituem uma poderosa ferramenta na medida em que podem ser utilizadas como instrumentos legais para qualquer nível de ação (ICMBio, 2018).

O Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção do ICMBio trás a lista de espécies ameaçadas do Brasil e classifica a *Potamotrygon falkneri* como menos preocupante. Táxons de distribuição ampla e táxons abundantes normalmente são incluídos nesta categoria. Assim como União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) em sua *Red List*, também classifica a espécie com dados insuficientes.

Conforme a Estratégia Mundial para a Conservação, a conservação dos recursos vivos, assim como o desenvolvimento, destina-se aos homens. É um dos pré-requisitos para o desenvolvimento perene e um dever ético para com as futuras gerações. O documento é um marco para os princípios que norteiam as políticas nacionais de conservação da natureza, pois deu grande ênfase a necessidade de aliar essas políticas as preocupações sociais. Nesse contexto, salienta o uso

sustentável dos recursos naturais, ao lado da preservação, como um dos instrumentos da conservação da flora e da fauna (GASTAL, 2002).

Nesta conjuntura, os Planos de Ação Nacional para a Conservação das Espécies Ameaçadas de Extinção ou do Patrimônio Espeleológico (PANs), são instrumentos designados para políticas públicas no que tange as espécies ameaçadas de extinção. Os PANs foram adotados pelo governo brasileiro como estratégias de conservação para espécies ameaçadas, tendo como objetivos principais a troca de experiências entre diversos atores, advindos de instituições governamentais e de setores da sociedade, no sentido de agregar e buscar novas estratégias de conservação, reunir e potencializar os esforços, além de racionalizar a captação e gestão dos recursos para conservação das espécies ou ambientes focos dos Planos de Ação.

O Plano de Ação Nacional para Conservação de Espécies Ameaçadas de Extinção é um instrumento de gestão oficial do governo brasileiro, por meio de portaria publicada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e de políticas públicas, construído de forma participativa pactuadas com a sociedade, a ser utilizado para o ordenamento e a priorização de ações para a conservação de espécies e ambientes naturais, com um objetivo estabelecido em um horizonte temporal definido (ICMBio,2018).

Neste cenário, considerando a necessidade de controlar o uso de raias de água continental da família Potamotrygonidae, o governo brasileiro sanciona os PAN's para a *Potamotrygon leopoldi*: PAN Peixes Amazônicos, para a Conservação de Espécies de Peixes Ameaçados de Extinção da Amazônia o PAN Baixo e Médio Xingu, para a Conservação das Espécies Endêmicas e Ameaçadas de Extinção da Fauna da Região do Baixo e Médio Xingu e o Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Tubarões e Raias Marinhos Ameaçados de Extinção, PAN Elasmobrânquios no Brasil, para a conservação e manejo dos estoques de peixes, com enfoque na família Potamotrygonidae de forma geral.

As espécies comercializadas legalmente são: *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi*, *Potamotrygon sp.* e *Potamotrygon schroederi* (Portaria Nº 22, de 27 de Abril de 2011 do Ministério da Pesca e Aquicultura), no entanto pelo fato de existirem muitos problemas quanto à classificação taxonômica é possível que espécies similares e/ou mesmo espécies críticas também possam estar sendo comercializadas (VALENTIM, 2011).

O Brasil possui a maioria dos regulamentos relacionados à coleta da natureza e exportação de potamotrigonídeos. O Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA) é responsável por desenvolver e fazer cumprir estes regulamentos. Em 2008, o IBAMA desenvolveu um sistema de cotas, que permite um número limitado das seis espécies designadas a serem exportadas do Brasil anualmente. O fornecimento de potamotrigonídeos selvagens a instituições são realizados com os regulamentos e garantem que os importadores e exportadores possuam a documentação apropriada para espécies em questão. (REYNOLDS; HORNBROOK; STETTNER,2017).

Por mais que haja Instruções Normativas para fins de regulamentação, proibição, ornamentação, aquarofilia e pesca, Barreto et al. (2017) consideram que no Brasil, as legislações para as pescarias de elasmobrânquios são escassas, além de o monitoramento e gestão serem insuficientes.

Wosnick et al.(2019) afirmam que a falta de políticas públicas e planos de manejo para as raias de água doce aponta a necessidade urgente de mais estudos visando determinar qual a situação dos estoques em todas as regiões do país.

## **2.2 História Natural da *Potamotrygon falkneri***

As raias de água doce tiveram sua origem a partir de um ancestral marinho; uma hipótese provável é a de “incurção marinha”, ou seja, esse ancestral teria entrado em ambientes dulcícolas durante os eventos geológicos de separação dos continentes, ficando confinadas nestes ambientes. As espécies marinhas que resistiram a tais mudanças ambientais passaram por adaptações e modificações severas, o que as tornaram aptas à vida em água doce, porém ainda não há um consenso de qual grupo marinho seria esse ancestral. Exemplos destas adaptações podem ser observados nas raias de água doce, como a baixa concentração de ureia nos fluidos corporais e a intolerância à salinidade. Assim, a irradiação adaptativa foi o principal evento evolutivo para a diversidade das raias dentro dos ambientes de água doce (VALENTIM, 2011).

O Brasil é o maior país sobreposto à gama natural das raias de água doce e possui, em 2004, a maior concentração de espécies de potamotrigonídeos (ARAÚJO et al., 2004). Dentre elas a *Potamotrygon falkneri*, homônimo de *Potamotrygon menchacai* (Achenbach 1967) e *Potamotrygon castexi* (Castello e Yagolkow-ski 1969). Esses animais possuem o corpo achatado dorsoventralmente e cauda com

até três ferrões retosserrilhados, que contém toxinas. Devido a essa característica, os potamotrigonídeos causam grande temor aos banhistas e pescadores, pois podem causar acidentes que provocam ferimentos graves e bastante dolorosos (GARRONE NETO; HADDAD-JUNIOR, 2009).

A *Potamotrygon falkneri*, possui como distribuição geográfica a Argentina, o Brasil, o Peru e a Bolívia. (LASSO et al., 2016). Os saltos de Sete Quedas representavam uma barreira para a dispersão da ictiofauna no rio Paraná. Com o fechamento da barragem e o enchimento do lago da hidrelétrica de Itaipu, a jusante, em 1982, a barreira deixou de existir, tornando-se possível o estabelecimento, no alto rio Paraná, de diversas espécies de peixes anteriormente confinadas ao trecho inferior. Dentre estas, três espécies de raias continentais da família Potamotrygonidae – *Potamotrygon sp.*, *P. motoro* e *P. falkneri* (SILVA; GOULART, 2007).

*Potamotrygon falkneri* atualmente, habitam as bacias hidrográficas: Amazonas (Brasil, Bolívia, Peru), Paraná-Paraguai (Argentina, Brasil), conforme figura 3 (LASSO et al., 2016). Sua distribuição geográfica vem se ampliando a cada ano, principalmente pelas eclusas existentes nas usinas hidrelétricas instaladas ao longo da drenagem Tietê-Paraná (GARRONE NETO et al., 2007), vivem em fundo arenoso ou lamacento e às vezes com o corpo parcialmente encoberto (VALENTIM, 2011).

Figura 3: Mapa de distribuição geográfico da *P. falkneri*



Fonte: (LASSO et al., 2016).

Em relação às outras raias que coabitam a bacia do Paraná no Paraguai, a *P. falkneri* se distingue de *P. motoro* por não apresentar os ocelos formados por anéis concêntricos escuros na parte superior do disco, da *P. brachyura*, por não ter um padrão reticulado na parte traseira do disco, da *P. histrix*, por não apresentar coloração do disco dorsal e ventral em cinza escuro e da *P. tatiana*, por não possuir manchas exclusivamente no formato vermicular, conforme figura 4. Seu disco geralmente não possui coloração na barriga, mas ocasionalmente pode ter pontos escuros (LASSO et. al., 2016).

Figura 4: Exemplar de *P. falkneri*. São Paulo, 2020.



Fonte: Foto cedida por Danilo Cardoso.

*Potamotrygon falkneri*, possui como características, possuem dentículos pequenos e assimétricos, em formato de estrela, com 30 a 50 carreiras longitudinais na mandíbula superior e 29 a 44 na mandíbula inferior, cauda superiormente, inserem-se os ferrões, em número variando de um a quatro, todos implantados no mesmo local. Os ferrões têm origem dérmica e parecem ser frequentemente substituídos (SILVA; GOURLART 2007; LOBODA; CARVALHO, 2013; LASSO et al., 2016), são caracterizadas pelo corpo discoide, prolongado por uma cauda em forma de chicote e armada de “ferrão”.

É um animal carnívoro, de hábito ictiófago, possui uma dieta baseada principalmente em peixes, embora também possa se alimentar de moluscos, crustáceos e insetos aquáticos. Silva e Goulart (2007) e Garrone Neto et al., (2007) relataram diferenças na dieta de acordo com a sazonalidade, sendo os peixes, o

principal alimento consumido durante a estação seca e os moluscos gastrópodes durante o período de inundação.

*Potamotrygon falkneri* apresenta uma variação ontogenética em relação aos itens alimentares, na qual os juvenis apresentam uma dieta baseada principalmente em insetos aquáticos (Trichoptera e Hemiptera), os adultos se alimentam além de peixes, também de insetos e caranguejos (SILVA; GOULART, 2007; GARRONE NETO; UIEDA, 2012).

A reprodução da *Potamotrygon falkneri* é sexuada com fecundação interna e descrita como matrotífica vivípara, com o desenvolvimento de trofonemata para a nutrição do embrião e os filhotes são expelidos para a água antes de completarem seu estágio de maturação; todos que pertencentes à ordem Myliobatiformes exibem este padrão único no seu modo reprodutivo (GARRONE NETO, 2010; VALENTIM, 2011).

### 2.2.1 Aspectos Reprodutivos

As estratégias reprodutivas de elasmobrânquios incluem oviparidade, viviparidade aplacental e viviparidade placentária. As espécies vivíparas podem ter características de desenvolvimento lecitotróficas ou matrotólicas. O desenvolvimento lecitotrófico ocorre quando os embriões derivam sua nutrição exclusivamente das reservas da gema e ocorre em muitas espécies vivíparas aplacentárias. O desenvolvimento matrotófico ocorre quando embriões complementam as reservas da gema, obtendo nutrientes de origem materna durante a gestação e também ocorre em muitas espécies aplacentárias e em todas as espécies vivíparas placentárias (CONRATH, 2004).

Nas *P. falkneri*, assim como para as raias da família Potomotrygon a reprodução é caracterizada pelo desenvolvimento de vilosidades na parede interna uterina (trofonematas), cuja secreção rica em lipídeos (“leite uterino”), transferida aos embriões oralmente e/ou por via espiracular, complementando a nutrição intra-uterina através da haste e bolsa vitelínicas (GARRONE NETO, 2010).

A reprodução dos Potamotrigonídeos em seu *habitat* natural parece estar intimamente ligada ao ciclo hidrológico sazonal; fecundidade e tempo de gestação variam significativamente entre diferentes espécies de potamotrigonídeos, com tempo de gestação de 3 a 11 meses e tamanho da ninhada de 1 a 21 filhotes.

(CHARVET-ALMEIDA et al., 2005). O efeito de condições externas e internas do aquário, particularmente a ingestão de alimentos e o manejo (por exemplo, fotoperíodo e temperatura) afetam a reprodução destes animais; o momento, a frequência da reprodução e a gestação, permanecem incertos. O tempo de gestação em aquários para *P. motoro* é aproximadamente 3 meses, enquanto *P. tigrina* e *P. leopardi* têm tempo de gestação em aquários de aproximadamente 4 meses (REYNOLDS; HORNBOOK; STETTNER, 2017).

### **2.2.2 Aspectos Morfológicos dos Machos**

Em muitas espécies de elasmobrânquios, os testículos sofrem mudanças sazonais anuais na espermatogênese. Isso geralmente é marcado por alterações no índice gonadossomático (GSI) e em algumas espécies, a presença de uma zona degenerada nos testículos e as mudanças sazonais no GSI correspondem à estação anual de reprodução, enquanto outras se reproduzem o ano todo, independentemente do GSI, ou têm uma estação de acasalamento definida, mas nenhuma mudança no GSI. Acredita-se que as alterações na função testicular e a presença de uma zona degenerada nos testículos estejam ligadas a ciclos sazonais nos níveis dos hormônios hipofisários (DALY, 2008).

A presença de um eixo hipotálamo-hipófise-gonadal em elasmobrânquios tem sido sugerida, embora muitos aspectos desse eixo permaneçam indefinidos. A presença de várias formas de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) no hipotálamo dos elasmobrânquios está bem estabelecida e são exclusivas do grupo. Sugere-se que a estimulação da hipófise por GnRH ocorra através da circulação geral, pois não há ligação neural ou vascular direta entre o hipotálamo e a hipófise nos elasmobrânquios (DALY, 2008).

Assim como nas espécies de mamíferos, os testículos nos elasmobrânquios são os principais locais de produção de andrógenos (HAMLETT et al., 1999). Os testículos são órgãos alongados emparelhados, suspensos da parede dorsal na extremidade anterior da cavidade do corpo pelo mesório. Existem três tipos diferentes de testículos em elasmobrânquios, o radial; o diamétrico e o terceiro é uma combinação dos outros dois tipos (HAMLETT et al., 1999).

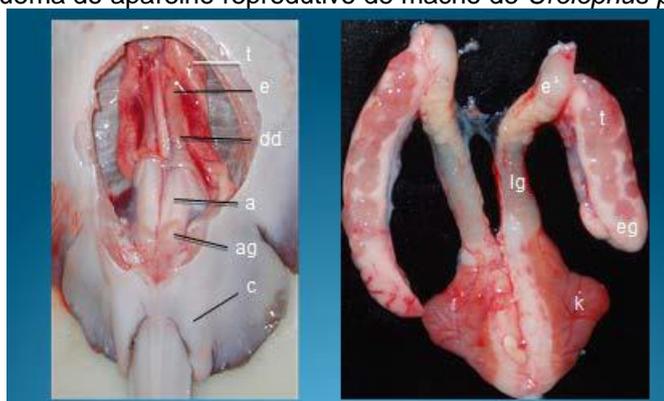
O epidídimo está conectado ao testículo através do ducto deferente, que são túbulos finos que atravessam o mesórquio na borda anterior do testículo.

Espermatozoides maduros são descarregados do testículo através do ducto eferente, estes aderem ao epidídimo, que se expande para formar um tubo longo com complexas convoluções. O epidídimo é contínuo com a próxima seção do ducto genital, o ducto deferente, também conhecido como ducto de Wolff. O ducto deferente e a vesícula seminal que são contínuos e funcionam como áreas de armazenamento de produtos seminais, e em algumas espécies o espermatozoide é empacotado em espermatozeugmatas ou espermatóforos. O ureter fica entrelaçado com a porção terminal da vesícula seminal e ambas terminam na parede anterior do seio urogenital. O seio urogenital se expande para uma cloaca comum por meio de uma única papila grande (CONRATH, 2004).

Daly (2008) sugeriu que o sistema reprodutivo de machos de elasmobrânquios é constituído por várias estruturas-chave envolvidas no desenvolvimento do espermatozoide e na entrega destes ao trato reprodutivo feminino. Algumas dessas estruturas são homólogas às estruturas de mamíferos, enquanto outras são exclusivas do grupo. A principal diferença é que os testículos elasmobrânquios não possuem túbulos seminíferos.

Abaixo na figura 5 o posicionamento dos órgãos reprodutivos de macho de *Urolophus paucimaculatus*.

Figura 5:Esquema do aparelho reprodutivo de macho de *Urolophus paucimaculatus*



Fonte: DALY (2008).

Ampola do canal deferente (a), glândula alcalina (ag), cláspes (c), canal deferente (dd), epidídimo (e), órgão epigonal (por exemplo), rim (k), glândula de leydig (lg), testículo (t).

Os apêndices copulatórios de machos de elasmobrânquios consistem nos cláspes emparelhados, que se estendem posteriormente das barbatanas pélvicas (HAMLETT et al., 1999). Cláspes não possuem um lúmen como o pênis de mamífero, mas sim um sulco que corre longitudinalmente no lado dorsal dos

clásperes para ajudar na passagem do sêmen (DALY, 2008). Essas estruturas longitudinais auxiliam o macho na cópula, direcionando o sêmen para a cloaca da fêmea. Os machos utilizam um ou ambos dos seus clásperes durante a cópula para transferir seu sêmen. Em algumas raias, os clásperes possuem tecido erétil (CONRATH, 2004).

Clásperes de raias (Myliobatiformes) são pouco documentados em comparação com clásperes de rajidae. Em geral, os potamotrygons têm morfologia externa semelhante ao clásper, porém apresentam alguma variação morfométrica entre as espécies. Em valores absolutos, *P. motoro* tem o maior fecho, enquanto *P. madalena* tem o menor clásper entre todas as espécies congênicas. No entanto, proporcionalmente à largura do disco, *P. marinae*, *P. magdalenae* e *P. yepezi* possui clásperes maiores, enquanto *P. amandae*, *P. motoro* e *P. falkneri* possui menor clásperes (MOREIRA et al., 2018).

Características macroscópicas, como tamanho e nível de consolidação da cartilagem do clásper, são critérios aplicáveis à determinação da maturidade gonadal de elasmobrânquios machos (SILVA; GOULART, 2007). Machos foram considerados sexualmente maduros quando os clásperes apresentavam-se rigidamente calcificados e a presença de sêmen nas vesículas seminais era confirmada (GARRONE NETO, 2010).

Tanto machos de *P. motoro* como de *P. falkneri* apresentaram variações nos comprimentos dos seus clásperes, sugerindo que seu crescimento seja possivelmente alométrico em relação ao crescimento do seu corpo e relativamente mais intenso após atingirem a maturidade sexual (GARRONE NETO, 2010) A calcificação do clásper pode ser uma simples e maneira rápida de determinar se elasmobrânquios machos estão maduros; no entanto, avaliações de maturidade baseadas somente na calcificação pode ser impreciso, pois os clásperes podem ter se desenvolvido antes da espermatogênese (CONRATH, 2004).

Para Silva e Goulart (2007), a largura do disco em que machos de *P. motoro* e *P. falkneri* atingem a maturidade gonadal é estimada pelo tamanho relativo do clásper. O tamanho do indivíduo, a partir do qual o comprimento proporcional do clásper se estabiliza, é o mesmo observado nos maiores machos, considerando assim indicativo para determinação do tamanho quando machos atingem a maturação gonadal.

A localização da zona germinativa dentro do testículo e a direção da maturação dos espermatocistos variam entre as espécies elasmobrânicas (HAMLETT et al., 1999). A espermatogênese e a esteroidogênese são as duas funções dos testículos, mas há diferenças notáveis na estrutura e na função em comparação aos testículos de mamíferos (DALY, 2008).

### 2.2.3 Espermatogênese em Elasmobrânquios

Como nos mamíferos, os espermatozoides de elasmobrânquios sofrem um período de maturação no epidídimo (DALY, 2008 e CONRATH, 2004).

Hamlett et al., (1999), Conrath (2004) e Maruska; Gelsleichter (2011) definiram com os estudos histológicos de algumas espécies de elasmobrânquios sete estágios da espermatogênese representada no quadro abaixo.

Quadro 1 - Descrição da espermatogênese em elasmobrânquios. São Paulo, 2020.

Estágio	Descrição
I	Células germinativas dispersas ainda não ligadas por uma membrana basal a um espermatocisto
II	Camada de espermatogônia e células de Sertoli associadas se dividem e circundam um lúmen central e são limitadas por uma membrana basal que forma o espermatocisto
III	Sofrerão mitose para se tornar-se espermatócitos primários, que passarão pela primeira divisão meiótica a tornaram-se espermatócitos secundários
IV	Espermatócitos secundários foram submetidos à segunda divisão meiótica para se

	tornarem-se espermatíde
V	Espermatídes submetidos à espermiogênese e possuem uma região de cabeça e cauda, mas o espermatozoide ainda não se organizou em feixes
VI	Espermatozoides maduros se organizam em pacotes, em formato dispostos em espiral ao longo dos espermatocistos
VII	Final da espermatogênese que consiste em espermatocistos vazios, espermatogonia livre e espermatozoides livres

Adaptado de Conrath, (2004).

DALY (2008), sugeriu que as células de Sertoli no testículo elasmobrânquico sofrem um padrão cíclico de proliferação e degeneração concomitante à espermatogênese, incluindo mitose durante os estágios iniciais do desenvolvimento do espermatocisto. No estágio da espermatíde, há um grande aumento no volume do retículo endoplasmático liso na célula de Sertoli. Isso corresponde a um aumento nas concentrações de testosterona e DHT no soro, que supostamente aumentam durante os estágios médio e tardio da espermatogênese. Essas observações levaram à sugestão de que as células de Sertoli nos espermatocistos pós-meióticos são a principal fonte de andrógenos testiculares nos elasmobrânquios.

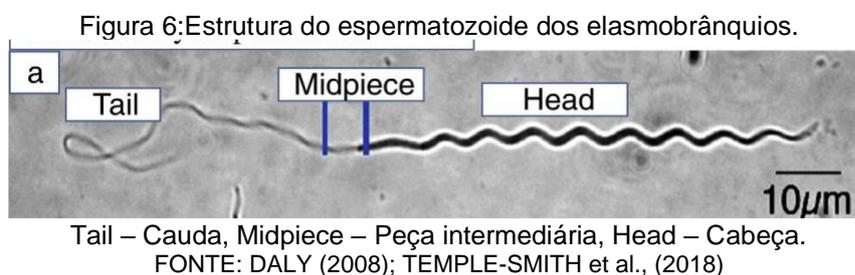
Uma maneira mais detalhada de rastrear a formação de espermatozoides no testículo ao longo do tempo é fazendo cortes histológicos do testículo (CONRATH, 2004). Portanto são necessários estudos histológicos para a determinação da espermatogênese em *Potamotrygon falkneri*.

#### 2.2.4 Morfologia do espermatozoide

Os vertebrados apresentam uma ampla gama de características reprodutivas que incluem fertilização externa e interna, uma ampla variedade de estruturas

sociais e comportamentos de acasalamento, formação e proteção de parceiros, estruturas especializadas de óvulos (oócitos) e a competição de espermatozoides. Essas características, como aparecem em várias espécies e grupos, influenciaram a evolução da estrutura e função dos espermatozoides para garantir uma reprodução bem sucedida (TEMPLE-SMITH et al., 2018).

Conforme a Figura 6, Daly (2008); Temple-Smith et al., (2018) afirmaram que, como nos mamíferos e outros vertebrados, a estrutura do espermatozoide dos elasmobrânquios é geralmente semelhante, sendo constituída por uma cabeça contendo o núcleo e acrossomo, peça central contendo mitocôndrias e cauda com axonema.



A cabeça dos espermatozoides de alguns condrictes é longa (> 30 μm) e possui formato helicoidal, com o núcleo seguindo o mesmo curso. A peça central do espermatozoide elasmobrânquico consiste em uma haste axial sendo uma estrutura exclusiva da classe condrictes e presente em alguns anfíbios; em torno da qual as mitocôndrias estão dispostas, e estas, por sua vez, são cercadas por uma bainha fibrosa e substitui as nove fibras grossas que compõem o centro da peça central do espermatozoide de mamíferos. O flagelo (ou cauda) é composto por duas estruturas principais, o axonema central e as colunas longitudinais. Para produzir a motilidade espermática à medida que o axonema central gira em seu eixo longitudinal ao longo do comprimento do flagelo, as colunas longitudinais permanecem fixas nas posições 3 e 8 do duplete para criar uma estrutura de dupla hélice (DALY, 2008; TEMPLE-SMITH et al., 2018).

Os espermatozoides de peixes variam em estrutura, refletindo sua história evolutiva de mais de 550 milhões de anos (MARIA; AZEVEDO; CARNEIRO, 2009). Desde o início do século, cientistas têm procurado intensamente desenvolver ensaios laboratoriais que predigam acuradamente a fertilidade do sêmen. No entanto, tais metas têm sido de difícil obtenção, uma vez que a maior parte dos problemas reside nos diferentes atributos que o espermatozoide deve possuir para

fertilizar o ovócito, e em como a fertilização é definida. Infelizmente, nenhum teste isolado é capaz de prever a fertilidade de uma amostra de sêmen, mas o exame de várias características pode determinar uma maior fertilidade potencial (ARRUDA et al., 2011).

### **2.3 Avaliação Espermática**

Desde de 2003, muitas são as técnicas de manipulação de sêmen já estabelecidas para várias espécies de peixes, com especial destaque para as famílias Characidae, Prochilodontidae, Anostomidae, Cyprinidae, Siluridae e Salmonidae. Mesmo assim, com exceção da truta arco-íris e o salmão do Atlântico, ainda há muitas questões básicas para serem respondidas no que tange às técnicas de conservação de sêmen de muitas espécies tropicais de interesse econômico e ambiental (CAROLSFELD et al., 2003).

O armazenamento de sêmen de peixes por longos períodos de tempo é uma ferramenta importante que possibilita a manutenção da variabilidade genética de uma população para uso futuro. Sua utilização em uma eventual tentativa de recuperação de uma população de peixes, garante uma base genética mais ampla, produzindo indivíduos com maior capacidade de adaptação e menores chances de sucumbir diante das alterações causadas no meio ambiente (MARIA; AZEVEDO; CARNEIRO, 2009). A avaliação espermática permite avaliar estruturas que estão intimamente ligadas com a capacidade reprodutiva do animal, tais como lesões de membrana citoplasmática do espermatozoide e integridade de membrana acrossomal. A análise morfológica dos espermatozoides tem sido bastante utilizada na seleção de machos doadores de sêmen para o manejo reprodutivo ou para o uso em biotecnologias da reprodução de vários animais, sendo recentemente utilizada para algumas espécies de peixes de interesse econômico e ambiental (MARIA; AZEVEDO; CARNEIRO, 2009; MARIA et al., 2017).

Vários parâmetros seminais têm sido medidos e individualmente relacionados a fertilização em peixes tais como o pH, osmolaridade do fluido seminal, composição do plasma, densidade espermática ou dose inseminante, morfologia espermática, sobrevivência espermática, integridade da membrana espermática, integridade do DNA, motilidade e velocidade espermática (NEUMANN, 2019).

A avaliação das características seminais é imprescindível na rotina da reprodução artificial em qualquer espécie. Para descrição de um perfil espermático, são analisadas as características físicas do sêmen (volume, vigor, taxa e duração da motilidade espermática, concentração e morfologia) e as características morfológicas dos espermatozoides (SOLIS-MURGAS et al., 2011). É necessário o conhecimento desses parâmetros para que se possa avaliar a qualidade do sêmen coletado e, com isso, otimizar sua utilização no processo de fertilização artificial (VIVEIROS; GODINHO, 2008).

Os diluidores são soluções de sais ou de carboidratos que ajudam a manter a viabilidade das células durante o resfriamento. Além disso, o uso de diluidores pode estabilizar as condições físico-químicas durante a estocagem do sêmen, prolongando a viabilidade dos espermatozoides (MARIA et al., 2017).

#### *Volume*

O volume não tem um valor intrínseco biológico, e sim pela quantidade de células fecundantes que possa conter. O volume é muito variável entre as diversas espécies e até mesmo na mesma espécie, e pode ser influenciado pela estação do ano, clima, período de repouso sexual e método de colheita. (SOLIS-MURGAS et al., 2011).

#### *Concentração espermática*

A concentração ou densidade espermática expressa a quantidade de espermatozoides por ml de sêmen, podendo ser determinada pela contagem em câmaras volumétricas. Valores de concentração podem variar de acordo com peso e idade do peixe, época do ano, frequência de colheita e volume do ejaculado. (SOLIS-MURGAS et al., 2011). Uma das metodologias comumente empregadas para avaliação da concentração espermática de peixes é a contagem de espermatozoides em câmara hematimétrica de Neubauer (SANCHES et al., 2011)

#### *Vigor*

O vigor da motilidade avalia o tipo de movimento que os espermatozoides apresentam, isto é, o percentual de movimentos progressivos de uma amostra. Podem ser observados vários tipos de movimento: Movimento Progressivo;

Movimento Circular; Movimento Oscilatório e Movimento Retrógrado (SOLIS-MURGAS et al., 2011).

### *Motilidade*

A cauda do espermatozoide é geralmente subdividida em peça central e peça principal e tem capacidade para produzir energia química na forma de adenosina trifosfato (ATP), nos geradores de energia da célula - as mitocôndrias. As mitocôndrias, que variam grandemente em tamanho, forma e número entre espécies são geralmente associados à parte proximal da cauda, adjacente à peça intermediária, para formar a peça central. A peça principal, que geralmente é a parte mais longa do espermatozoide, usa a energia do ATP fornecer a força motriz através de uma estrutura chamada axonema ou filamento axial. O axonema geralmente se estende da peça intermediária até o final da cauda e, na maioria dos espermatozoides, possui uma estrutura distinta de microtúbulos, que também é comum a outros organelas móveis no corpo, por exemplo cílios. A função crítica do axonema em todas as organelas e células móveis, como os espermatozoides é separar uma molécula de fosfato de alta energia do ATP e converter a energia química liberada do ATP em energia mecânica que move a cauda e cria a motilidade avançada necessária para alcançar e fertilizar o oócito (TEMPLE-SMITH et al., 2018).

A motilidade espermática é a porcentagem de espermatozoides vivos e móveis e deve ser avaliada imediatamente após a colheita de sêmen. A motilidade é um dos principais parâmetros a serem considerados na análise da qualidade do sêmen de peixes. Para tanto, deve-se levar em conta que a motilidade espermática é influenciada por inúmeros fatores, como temperatura, estado nutricional, estado sanitário, condições de análise, soluções ativadoras empregadas e espécie estudada (SOLIS-MURGAS et al., 2011).

A motilidade espermática é estimada de forma subjetiva, sendo analisada sob microscopia óptica, com uma gota do sêmen entre lâmina e lamínula, estimando-se sua porcentagem visualmente. No entanto, é a técnica mais utilizada na rotina laboratorial e continua tendo grande valor, principalmente para diferenciar sêmen de baixa e alta qualidade. A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozoides é importante devido ao fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides (ARRUDA et al., 2011).

A técnica subjetiva tem seu mérito e por muito anos era a técnica disponível para avaliação da motilidade espermática em peixes. Com o avanço da tecnologia esta técnica está sendo substituída por outras mais precisas e objetivas. Avaliação objetiva da motilidade ocorre quando um software integra as sucessivas posições das cabeças dos espermatozoides em imagens consecutivas de um vídeo do movimento espermático, calculando as trajetórias e características de movimento (NEUMAN, 2019).

Computer Assisted Sperm Analyses (CASA) refere-se a um sistema automatizado (Hardware e Software) para visualizar e digitalizar imagens sucessivas dos espermatozoides, processando, analisando e fornecendo informações acuradas, precisas e significativas da cinética individual das células, e valores estatísticos médios sumarizados da população global. Os espermatozoides móveis observados são posteriormente identificados em imagens sucessivas, que permitem estabelecer suas trajetórias. Finalmente as trajetórias obtidas são matematicamente processadas permitindo a definição dessas trajetórias de forma numérica. Os resultados desses processamentos são refletidos em uma série de parâmetros que definem precisamente o exato movimento de cada espermatozoide (ARRUDA et al., 2011).

#### *Avaliação morfológica*

Alterações morfológicas nos espermatozoides podem ocorrer após o aumento ou a diminuição da osmolaridade do meio que os circunda. Segundo Solis-Murgas et al., (2011), as alterações primárias (flagelo dobrado, cabeça isolada, gotas citoplasmáticas proximal e distal) ocorrem durante a espermatogênese, em decorrência de causas que acometem os reprodutores, tais como enfermidades, consanguinidade, restrição alimentar e estresse ambiental. Por outro lado, as alterações secundárias (flagelo quebrado, enrolado, degenerado, macrocefalia, microcefalia) estariam relacionadas aos procedimentos de manejo durante a colheita do sêmen.

A avaliação morfológica dos espermatozoides de peixes pode auxiliar na caracterização de amostras seminais, fazendo inferência sobre seu potencial fertilizante ou de amostras congeladas de sêmen e explicando insucessos de reprodutores tidos como aptos após análises convencionais de motilidade espermática (SOLIS-MURGAS et al., 2011).

Para uma análise da lâmina a ser observada, são necessários alguns pré-requisitos quanto a coloração, como: formulação correta do corante, utilizando-se material de qualidade, tempo de aplicação da técnica adotada e o custo da metodologia empregada (BARTH; OKO, 1989). Como o espermatozoide é uma célula translúcida, sua visualização sob microscopia óptica comum não é muito nítida para avaliação do contorno celular, por isso, quando se dispõe somente de microscopia óptica comum deve-se fazer uso da técnica de esfregaço corado (ARRUDA et al., 2011).

Na preparação da amostra de sêmen para a avaliação morfológica dos espermatozoides geralmente há necessidade do uso de soluções fixadoras para manter inalteradas suas características espermáticas. No preparo dos esfregaços são utilizados corantes específicos que auxiliam a visualização das estruturas espermáticas que são translúcidas (ARRUDA et al., 2011; MARIA et al., 2017).

As membranas espermáticas são estruturas especializadas e exercem funções fundamentais na fecundação. Os lipídeos das membranas celulares desempenham funções biológicas, como moléculas alimentares, depósitos de energia altamente concentrados, e promovem a sua integridade estrutural. A integridade da membrana espermática é essencial na viabilidade seminal, pois garante a sua homeostase celular e, conseqüentemente, mantém as suas características de motilidade, sendo esses requisitos essenciais para manter a capacidade de fecundação da célula espermática (ARRUDA et al., 2011).

Os espermatozoides são células metabolicamente ativas que realizam tanto glicólise como a respiração mitocondrial, mantendo um adequado balanço energético necessário para o transporte e demais funções celulares. Apesar de os espermatozoides não dependerem completamente da atividade mitocondrial para manter seu padrão de motilidade flagelar. Além disso, vários estudos vêm demonstrando um papel importante da glicólise na motilidade espermática e acredita-se que, na ausência de respiração mitocondrial, a glicólise consiga sustentar o movimento flagelar e a hiperativação (BLUMER, 2009).

## **2.4 Métodos de Contenção Animal**

As práticas de contenção evoluíram com a domesticação de animais para uso humano, como animais de criação, de produção para alimentação, animais utilizados

em trabalho, esporte e companhia (FOWLER, 1995). Conter um animal significa limitar seus movimentos ou, até mesmo, imobilizá-lo completamente. A contenção de um animal pode ser física ou mecânica, quando utilizamos as mãos ou algum equipamento, ou química, quando utilizamos tranquilizantes ou anestésicos para imobilizar o animal (TASSI et al., 2008).

Tentativas e erros combinados com as experiências compartilhadas de outros técnicos acabaram produzindo práticas satisfatórias. Uma pessoa que se compromete a imobilizar a atividade de um animal ou contê-lo está assumindo uma responsabilidade que não deve ser considerada levemente. Cada incidente de contenção tem algum efeito no comportamento, na vida ou em outras atividades de um animal (MILLER; FOWLER, 2014).

O animal sofre um estresse muito grande quando é imobilizado, por isso a contenção deve ser realizada apenas quando for realmente necessária. Os principais motivos que necessitam da contenção de um animal são: transferência de recinto transporte para outra instituição ou soltura, realização de exames clínicos e tratamentos, coleta de material biológico (sangue, secreções e outros) e realização de ações de manejo (sexagem, pesagem e outros) (TASSI et al., 2008).

As contenções físicas e químicas atualmente são praticadas com segurança. Antigamente, apenas a contenção física era realizada. No momento em que o homem aprendeu sobre imobilização química, através do uso de flechas envenenadas, os efeitos fisiológicos do movimento restrito foram estudados e evoluídos. (MILLER; FOWLER, 2014).

A contenção química refere-se ao estado induzido por medicamento, que produz modificação favorável do comportamento, sedação, analgesia, ou relaxamento muscular. Não existem atualmente medicamentos de contenção química que possam produzir o grau ideal de cada uma destas propriedades em todos os animais (BERTOZZO et al., 2008).

Em ambiente natural, dependendo da finalidade, a captura de raias é geralmente realizada com diferentes instrumentos de pesca, tais como: o puçá de mão, também conhecido como rapiché na Amazônia central; malhadeiras; espinhel e arpão, também conhecido como zagaia (OLIVEIRA, 2012).

Diferentemente de peixes teleósteos e algumas espécies de tubarões e raias marinhas, as raias potamotrigonídeos dulcícolas possuem ferrões com toxinas em suas caudas que podem provocar úlceras que têm um período de cicatrização de

até três meses (GARRONE-NETO; HADDAD-JUNIOR, 2009). Desta forma, em raias de água doce, as práticas necessárias ao manuseio de colheita de sangue requerem procedimentos de segurança para evitar a ocorrência desses graves acidentes ao manipulador (OLIVERA, 2012).

Ao lidar com animais silvestres, devem-se reduzir as possibilidades de acidentes, utilizando-se métodos de contenção seguros (TASSI et al., 2008). Os potamotrongonídeos toleram bem o manuseio se algumas considerações especiais forem atendidas. As redes podem emaranhar em suas caudas com ferrões, resultando em acidentes aos manipuladores ao tentar desembaraçar um animal estressado e/ou danificar sua cauda ou coluna, com risco, até mesmo, de infecção secundária. Faz-se necessária a utilização de redes grandes e rasas para evitar danos à cauda e de materiais como borracha, vinil transparente ou nylon (REYNOLDS; HORNBOOK; STETTNER, 2017). Nenhum procedimento deve ser realizado se não houver a imobilização completa do animal de forma segura, o uso de equipamentos adequados, como o puçá de mão, pois esse instrumento não causa ferimentos nos animais e permite que eles sejam capturados rapidamente, minimizando o efeito do estresse de captura, indesejável para os estudos fisiológicos e da pinça Foster para contenção mecânica do ferrão e simultaneamente da cauda (OLIVERA et al., 2012).

Oliveira et al., (2012) e Reynolds; Hornbrook; Stettner (2017) recomendam ao manusear potamotrongonídeos, utilizar luvas de couro resistentes, neoprene grosso, que permitam a mobilidade das mãos para reduzir o risco de acidentes causados pelo ferrão, bem como o rompimento da cauda e até mesmo a perda desse membro, o qual exerce importante função no equilíbrio natatório das raias e das atividades dependentes da natação, tais como: a caça, a fuga e o acasalamento. Esta recomendação se estende à compreensão da base da cauda para coleta de sangue, pois pode ser possível se ferir com os dentículos que cobrem a cauda de muitas espécies.

Deste modo, a captura e contenção de potamotrongonídeos devem ser feitas com cautela, onde no início o animal deva ser capturado com um puçá específico ou rede e sempre ser realizada o mais rápido possível para minimizar o estresse do animal.

### 3 OBJETIVOS

Para a realização deste estudo objetivou-se:

- Realizar uma revisão de literatura acerca da reprodução de raias de gênero *Potamotrygon*;
- Descrever e validar um protocolo para colheita de sêmen em raias de água doce, por meio de massagem manual;
- Realizar avaliação espermática comparativa entre protocolos de obtenção de sêmen, por massagem manual e sob contenção física e química;
- Realizar o teste de integridade da membrana;
- Realizar o teste da atividade citoquímica mitocondrial;

### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Aquário de São Paulo (São Paulo – SP; 23°35'36.5"S 46°36'51.1"W) e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA-FMVZ/USP) sob o protocolo no. 5200300919.

#### **Animais**

Para a realização deste projeto foram utilizados seis exemplares machos de *Potamotrygon falkneri*, mantidos em condições *ex situ*; todos os animais eram pertencentes ao plantel do Aquário de São Paulo (ASP) e toda a rotina de manejo como manutenção, limpeza, alimentação, condições ambientais e de saúde, foram igualmente oferecidas para todos os animais sob responsabilidade da Instituição.

Os animais estavam divididos em 2 tanques, sendo três em cada um, com temperatura e PH da água aproximados em 27°C e 7.0 respectivamente.

Todos os animais foram identificados pelo número de microchip e a determinação da maturidade sexual foi realizada através de medidas morfométricas realizadas com fita métrica: (1) Largura do disco (LD): medida tirada da porção mais larga do disco e (2) Comprimento do disco (CD): distância entre a ponta do focinho e a margem posterior do disco. Os animais também foram pesados com balança eletrônica antes dos procedimentos.

### Delineamento Experimental Colheita de Sêmen

Para a realização da colheita de sêmen, os animais foram divididos em dois grupos distintos. Os três primeiros animais primeiramente foram submetidos a uma contenção física e os outros três a uma contenção química. Passados 53 dias, os protocolos de contenção foram invertidos entre os animais, conforme quadro 2.

Quadro 2 - Identificação dos Animais para cada protocolo. São Paulo, 2020.

Quantidade de animais	Identificação dos Animais	Protocolo de Contenção
6 ANIMAIS	1, 2 e 3	Física
	4, 5 e 6	Química
6 ANIMAIS	4, 5 e 6	Física
	1, 2 e 3	Química

Para a realização de ambos os protocolos, os animais foram retirados da água com o auxílio de um puçá de silicone e luvas raspas de couro para auxílio no manuseio. As medidas de segurança para proteção e isolamento do ferrão (figura 7) foram tomadas pela equipe de manejo do Aquário; com o auxílio de uma pinça de foster e uma espuma abrasiva, o ferrão foi envolvido com uma proteção de espuma de polietileno (atóxica, flexível e impermeável) com o intuito de tornar os procedimentos de manuseio dos animais totalmente seguros para a equipe.

Figura 7: Isolamento do ferrão de *P. falkneri* sob contenção física. São Paulo, 2020.



Fonte: Foto do arquivo pessoal de Fabiana Padilha.

Devido ao fato das raias de água doce liberam muito muco na superfície do corpo, o manuseio desses animais foi realizado tomando-se alguns cuidados de manejo para a segurança da equipe e da integridade física dos animais. Desta maneira em ambos os protocolos de contenção as raias foram posicionados de modo que ficaram apoiados em uma espuma umedecida, com água do próprio tanque do animal, em bandeja injetada em polipropileno de alta densidade, com as dimensões externas de altura 6,0 cm x largura 40,0 cm x comprimento 61,0 cm, para evitar a contaminação de água, muco e fezes, conforme figura 8.

Figura 8: Posicionamento de *P. falkneri* sobre a bandeja com espuma, com finalidade de colheita de sêmen. São Paulo, 2020.



Fonte: Foto do arquivo pessoal de Fabiana Padilha.

### **Procedimento de Colheita por Contenção Física**

Sobre a bandeja de espuma, os animais foram posicionados com a região ventral voltada para cima. Uma pessoa da equipe do ASP foi responsável por segurar a região do ferrão (protegida por espuma) e outra pessoa, também da equipe, foi responsável pela colheita. Uma das mãos auxiliava na contenção do disco e a outra iniciava uma massagem na região das ampolas dos ductos deferentes. Um tubo coletor foi posicionado na abertura da cloaca para a colheita do sêmen, que era eliminado a cada massagem realizada. Alguns cuidados foram tomados para que a presença de fezes, quando eliminadas, não contaminasse o material. Ao término do procedimento os animais foram devolvidos aos seus tanques de origem e acompanhados os padrões de natação e alimentação.

### Procedimento de Colheita por Contenção Química

Após os procedimentos de segurança de proteção do ferrão, os animais foram posicionados com a região posterior para cima para o recebimento do fármaco. A equipe do ASP estabeleceu como protocolo anestésico 3 mg/Kg de propofol aplicado diretamente nas brânquias (figura 9). Após o relaxamento total do animal, o mesmo foi posicionado com a parte ventral para cima, para a realização da massagem manual e colheita do material.

Figura 9: Aplicação do anestésico Propofol nas brânquias de *P. falkneri*. São Paulo, 2020.



Fonte: Foto do arquivo pessoal de Fabiana Padilha.

Durante todo o procedimento de contenção química, os animais foram monitorados quanto aos parâmetros fisiológicos, batimento cardíaco através do doppler, frequência respiratória, reflexo de movimento do corpo e clássper; a todo momento o animal foi irrigado com o auxílio de uma mangueira com água do próprio tanque de manutenção (figura 10). Ao término do procedimento os animais foram acompanhados até o retorno total da anestesia, devolvidos aos seus tanques de origem e acompanhados até a normalização dos padrões de natação e alimentação.

Figura 10: Monitoramento e irrigação de *P. falkneri*. São Paulo, 2020.



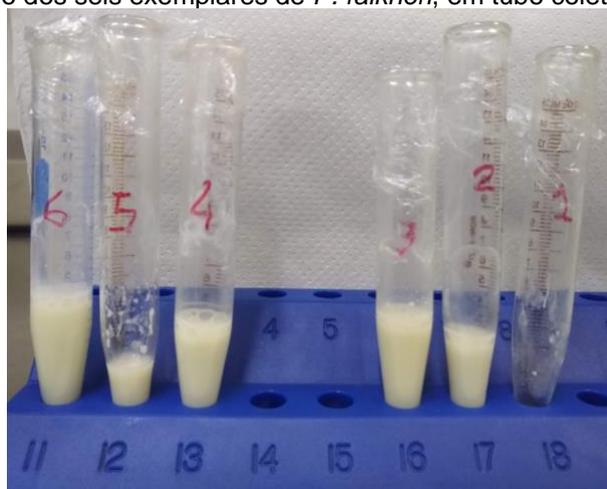
Fonte: Foto do arquivo pessoal de Fabiana Padilha.

## Análises Espermática

### 1º Análise: Cor, Volume e Concentração

Durante o processo de obtenção do sêmen, na abertura da cloaca, foi posicionado um tubo coletor esterilizado e graduado, onde foi armazenado o material ejaculado (figura 11) e realizada análise macroscópica de cor e volume (mL).

Figura 11: Ejaculado dos seis exemplares de *P. falkneri*, em tubo coletor. São Paulo, 2020.



Fonte: Foto do arquivo pessoal de Fabiana Padilha.

Para determinar a concentração utilizou-se o a Câmara hematómica de Neubauer. A concentração espermática foi determinada pela quantidade de espermatozoides presentes em um dado volume de ejaculado, sendo geralmente expressa em 10<sup>6</sup>/ml (milhões/ml); o número total de espermatozoides no ejaculado foi obtido através da multiplicação da concentração espermática pelo volume (GUIMARÃES, 2008).

### 2º Análise: Motilidade (%) e Vigor (0-5)

Realizada em tempo zero, logo após a colheita do sêmen, esta análise ocorreu de forma estimada e subjetiva (por um único pesquisador), através do uso de microscópios óptico, em aumento de 1000 X, com uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, para a motilidade (%) e vigor (0-5).

Para avaliação do vigor e da motilidade, usou-se a seguinte classificação (SOLIS-MURGAS et al., 2011):

- Grau 5: 90 a 100% dos espermatozoides móveis apresentam movimentação progressiva;
- Grau 4: 60 a 90% dos espermatozoides móveis apresentam movimentação progressiva;
- Grau 3: mais que 50% com movimentação progressiva;
- Grau 2: menos de 50% com movimentação progressiva;
- Grau 1: só se observam movimentos irregulares.

### **3º Análise: Sistema de avaliação computadorizada**

Esta análise ocorreu 5 horas após a colheita do sêmen, porém o material ejaculado foi armazenado em tubos do tipo Eppendorf, identificados com o número do animal, fracionado em 1 alíquotas de 200 µl e diluente para sêmen equino INRA 96 da IMV.

Esta avaliação do material ejaculado constitui-se de análise computadorizada de sêmen no (CASA) modelo Animal Breeders I software (v 00.00; Hamilton Thorne, Beverly, MA, USA)., quanto aos parâmetros de motilidade total e progressiva, além de células rápidas e estáticas, de forma precisa e objetiva, uma vez que o sistema automatizado (hardware e software) visualiza e digitaliza as imagens sucessivas dos espermatozoides, processando, analisando e fornecendo informações da cinética individual das células e valores estatísticos.

Os parâmetros gerados da motilidade espermática pelo sistema são: Motilidade Total (%), referente à população de células que estão se movendo com uma velocidade mínima determinada no setup, sendo a proporção de células móveis do total; Motilidade Progressiva (%), refere à porcentagem de células movendo-se progressivamente; Células rápidas e Células estáticas.

### **4º Análise: Testes de viabilidade**

#### **Teste de integridade da membrana**

Esta análise teve como objetivo avaliar a integridade da membrana plasmática através do protocolo já estabelecido da Eosina e Nigrosina, pelo método de coloração descrito por Barth e Oko (1989).

O método consiste em uma alíquota de sêmen na diluição de 1:2000 (sêmen/solução, respectivamente) que deve ser misturada ao corante da eosina e nigrosina; realiza-se o esfregaço sobre lâminas de microscopia e mantém-se na placa aquecida a uma temperatura de 30°C. Após secarem as lâminas foram analisadas em microscópio óptico sob óleo de imersão em aumento de 1000X. À partir da metodologia original recomendada pelos autores, para o sêmen de mamífero, foi realizada a contagem de 100 células e classificadas em íntegra (não coradas) e não íntegra (coradas).

O procedimento aplicado foi realizado para as seis amostras nas proporções apresentadas no quadro 3:

Quadro 3: Proporções utilizadas de solução de sêmen versus solução de corante para o preparo das lâminas. São Paulo, 2020.

Amostra	Solução de Sêmen (%)	Solução de Corante (%)
Amostra	100	0
	75	25
	50	50
	25	75
	0	100

Assim como Morales-Gamba et al. (2019), as células fortemente coradas em rosa foram consideradas como tendo uma membrana plasmática lesada, enquanto células levemente coradas foram consideradas ter membranas intactas.

### Teste da Atividade Citoquímica Mitocondrial

Foi realizada conforme desenvolvida por Hrudka (1987), baseado na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo complexo do citocromo c, em uma cascata de reações na qual o reagente é polimerizado e depositado nos locais da reação, tornando-se corado. Para realizar essa técnica, adiciona-se uma alíquota 25 µl de amostra incubada de sêmen juntamente com 25 µl de DAB/ml, a 37°C em banho maria, por 60 minutos, em tubos de do tipo eppendorf de coloração âmbar. Após a incubação, são confeccionados esfregaços em lâminas de vidro e fixadas em formol a 10% por 10 minutos, posteriormente as lâminas são secas ao ar sob proteção da luz. O procedimento foi realizado para as seis amostras de material ejaculado.

Salienta-se que foi utilizado a mesma proporção de solução de sêmen e corante, como descrita no quadro 3.

As lâminas foram observadas em microscópio de contraste e para o presente estudo foram contadas 100 células e classificadas de acordo com o grau de coloração da peça intermediária em 4 classes, assim determinando a atividade mitocondrial descrito por Hrudka (1987):

Classe I: Células espermáticas com peça intermediária totalmente corada indicando alta atividade mitocondrial.

Classe II: Células espermática com mais da metade dos segmentos corados (ativos) indicando atividade mitocondrial média a alta.

Classe III: Células espermáticas com menos da metade dos segmentos corados indicando baixa atividade mitocondrial.

Classe IV: Células espermáticas com peça intermediária totalmente descorada indicando ausência de atividade mitocondrial.

Foram consideradas patologias primárias: cauda quebrada, enrolada e degenerada, macrocefalia e microcefalia, e patologias secundárias: cauda dobrada, cabeça solta, gota citoplasmática proximal e gota citoplasmática distal.

### **Leitura e Interpretação das lâminas do Teste de integridade da membrana e Teste da Atividade Citoquímica Mitocondrial**

Para a leitura das lâminas deu-se (1) a contagem de 100 células visualizando a lâmina da esquerda para a direita com movimentos em zigue-zague; (2) evitou-se ler os campos de visão localizados nas extremidades da lâmina, onde a amostra costuma estar muito espessa, com maior possibilidade de sobreposições de células, ou muito fina, com poucas células espaçadas; (3) a contagem das células foi com auxílio de um com o contador manual de células; (4) contou-se apenas um defeito por célula anormal.

### **Análise dos Resultados**

As análises de teste de fertilidade, teste de viabilidade foram realizados em ambos os experimentos A e B com os 6 animais. Para descrição dos resultados, foram empregados as médias e os desvios padrão (média +/- desvio padrão) dos dados quantitativos obtidos. Todos os dados obtidos foram testados quanto a sua normalidade pelo teste Shapiro-Wilk. Após a definição de sua normalidade, os dados

foram analisados pelo teste t pareado ou por Wilcoxon pareado, em caso de valores não paramétricos. Os dados referentes à análise das fases de estudo foram analisados por ANOVA de medidas repetidas ou pelo teste de Friedman, em caso de valores não paramétricos. Todos os testes foram realizados considerando-se um nível de significância de 95% ( $p \leq 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Infelizmente, existe a escassez de trabalhos sobre colheita e utilização de sêmen em Elasmobrânquios. Apesar de uma literatura escassa, segundo Penfold e Wyffels (2019), duas técnicas para a obtenção de sêmen têm sido descritas: a primeira delas é através de massagem manual e a segunda, através de aspiração das ampolas uretrais. Essas técnicas foram descritas para tubarões (MASUDA et al., 2003), porém para raias de água doce, em especial *Potamotrygon*, apenas dois relatos foram encontrados. Os trabalhos de Dzyuba et al., (2019) e Morales-Gamba et al., (2019), com avaliação espermática, respectivamente de *P. motoro* e *P. wallacei*, relataram a necessidade da eutanásia dos animais para a realização dos experimentos, sendo que após a morte dos mesmos foi aplicada a técnica da massagem (DZYUBA et al., 2019) e do cateterismo (MORALES-GAMBA et al., 2019). Sendo assim, este trabalho ganha uma relevância ainda maior, visto que é o primeiro trabalho que descreve a colheita de sêmen por massagem manual em raias de água doce vivas (figura 12), do gênero *Potamotrygon* e com sucesso em 100% dos animais utilizados.

Figura 12: Obtenção do material ejaculado por massagem manual em *P. falkneri*. São Paulo.2020.



Fonte: Foto do arquivo pessoal de Fabiana Padilha.

Além da eficácia da obtenção de sêmen, a utilização de dois protocolos distintos da massagem, também traz resultados inéditos para o gênero. A comparação da análise espermática realizada entre animais contidos física e quimicamente, totalizando 12 amostras, não apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste ANOVA e pode ser observado na tabela 1 e todas as amostras apresentaram cor clara de ovo.

Tabela 1 - Valores dos protocolos na contenção física e química para as avaliações de volume, concentração, vigor e motilidade total no tempo 0. São Paulo, 2020.

<b>Análise</b>	<b>Contenção física (média ± erro padrão)</b>	<b>Contenção química (média ± erro padrão)</b>
Volume	4,76 mL ± 0,95	3,41 mL ± 0,95
Concentração	929,50 spz x 10 <sup>6</sup> / mL ± 70,97	1.071,67 spz x 10 <sup>6</sup> / mL ± 108,82
Vigor	2,34 ± 0,17	2,83 ± 0,16

Apesar de não ter sido encontrado informações em literatura pesquisada sobre o tempo de espermatogênese em *Potamotrygon*, tomou-se o cuidado de realizar um intervalo longo (50 dias) entre as inversões de protocolos de colheita, afim de não haver nenhum tipo estresse fisiológico nos animais, que interferisse nos resultados, e para garantir de que estaria sendo obtido um sêmen renovado. Mesmo com a ausência de informações sobre o tempo da espermatogênese, Dzyuba et al., (2019) demonstraram que os espermatozoides adquirem motilidade após o trânsito pelo epidídimo e são armazenados em estado móvel dentro das vesículas seminais.

As observações ao microscópio possibilitaram caracterizar um movimento de progressão do espermatozoide, no líquido seminal, devido a um movimento flagelar helicoidal (figura 13), porém as características morfológicas detalhadas da célula espermática não foram descritas neste experimento.

Figura 13: Imagem dos espermatozoides de *P. falkneri* em microscópio óptico, aumento 1000 X.



Fonte: Foto do arquivo pessoal de Fabiana Padilha.

Passadas 5 horas, todo o material, mantido sob o diluidor INRA 96 da IMV, foi submetido a nova análise no sistema CASA e os resultados podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2 - Valores em percentual para os procedimentos na contenção física e química segundo motilidade total no tempo 0 e após 5 horas no CASA e células rápidas e estáticas. São Paulo, 2020.

<b>Análise</b>	<b>Contenção física</b>	<b>Contenção química</b>
Motilidade total tempo 0	57,50% ± 6,55	62,50% ± 5,28
Motilidade total tempo 5 no CASA	51,83% ± 7,12	53,67% ± 6,12
Motilidade progressiva	13,67% ± 1,71	10,67% ± 1,12
Células rápidas	25,17% ± 2,68	25,17% ± 2,68
Células estáticas	28,17% ± 4,41	24,84% ± 5,58

Na tabela 2 podem ser visualizados os resultados obtidos pela análise das células no CASA. Os programas computadorizados para a avaliação espermática procuram ser mais objetivos e imprimir maior repetitividade às avaliações do que a habilidade humana em identificar padrões de motilidade ou de normalidade espermáticas (ARRUDA et al. 2011).

Na análise dos valores obtidos foi possível verificar que de modo geral a média da motilidade é maior para contenção química. Nos resultados observa-se também que não houve diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre o procedimento por contenção física e química. Ao compararmos os resultados da motilidade total no tempo 0,

realizada de forma subjetiva com a motilidade total no tempo 5 realizada no CASA, concluiu-se que a avaliação computadorizada se mostrou efetiva, visto que os resultados são homogêneos entre si.

Nas espécies que praticam fertilização interna, a cauda é necessária para mover os espermatozoides para o local de deposição, geralmente a cloaca, seio urogenital ou vagina, mas em algumas espécies diretamente no útero ou em parte do oviduto que recebe o(s) ovócito(s) na ovulação. Por estes percursos relativamente longos, a motilidade espermática progressiva para frente é um requisito absoluto. (TEMPLE-SMITH et al., 2018). Desta maneira, o resultado da motilidade progressiva pela contenção física é maior e mais satisfatório quando comparado com a química.

Considerando que a colheita de sêmen foi possível em 100% dos nossos animais, pode-se afirmar que todos estavam maduros sexualmente, segundo outras formas de avaliação.

Como resultado obtido das medidas morfométricas e do peso dos animais nos dois experimentos, (Tabela 3), os animais apresentaram médias de largura de disco de 31.4 ( $\pm$ DP) cm e de comprimento do disco de 32.91 ( $\pm$ DP) cm, além de ganho de peso de um experimento para o outro.

Tabela 3 – Dados Morfométricos (em cm e kg) da largura do disco (LD) e comprimento do disco dos animais (CD), segundo os animais avaliados de *P. falkneri*. São Paulo, 2020.

Animal	LD (cm)	CD (cm)	Peso (Kg) Experimento A	Peso (Kg) Experimento B
1	29.5	30	0.859	1.282
2	28	29,5	0.952	1.248
3	31	33	1.430	1.696
4	34	36,5	2.306	2.444
5	31	33,5	1.464	1.776
6	33	35	1.880	1.970

Os resultados morfométricos vêm de encontro aos descritos por Silva e Goulart (2007) e Garrone-Neto (2010), visto que os autores afirmaram que machos de *Potamotrygon falkneri* atingem a maturidade gonadal quando a largura do disco atinge um tamanho médio em torno de 26 – 27 cm.

Garrone-Neto (2010) também afirmou que, além da presença de sêmen nas vesículas seminais, outra classificação para a maturidade sexual em machos de

Potamotrygon dá-se pela calcificação e rigidez dos clásperes; essas informações também puderam ser confirmadas durante os manejos.

Mais um dado relevante foi observado durante a realização deste projeto; durante e após os manejos de obtenção de sêmen, alguns animais apresentaram movimento de cláspere, sinalizando que a estimulação por massagem possa ter desencadeado um reflexo da movimentação destas estruturas; estas informações podem ser associadas com os resultados de Daly (2008), visto que para o autor, os suportes cartilagosos, juntamente com a musculatura associada, auxiliam no movimento e na flexão dos clásperes durante a cópula. Se considerarmos que a reprodução desta espécie ocorre por fecundação interna (PENFOLD e WYFFELS, 2019), o ato da cópula (macho sobre a fêmea), pode estimular, por compressão, as vesículas seminais e facilitar a liberação do sêmen através da cloaca; além disto, este mesmo estímulo pode favorecer a movimentação dos cláspers, direcionando o ejaculado para a cloaca da fêmea.

Alguns estudos mostram que a reprodução de Potamotrygon pode estar diretamente relacionada ao ciclo hidrológico de cada região (CHARVET-ALMEIDA, ARAÚJO, ALMEIDA, 2005), porém acreditamos que as raias mantidas sob cuidados humanos não aparentam possuir sazonalidade reprodutiva, provavelmente porque as condições do ambiente são mantidas constantes ao longo do ano todo.

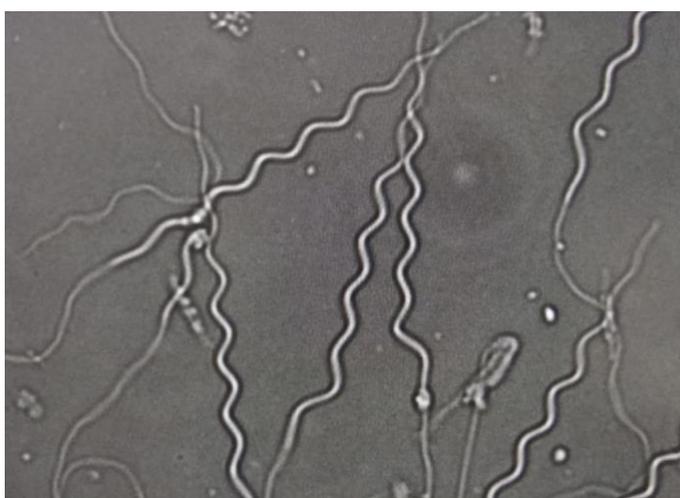
Contenções prolongadas são estressantes e devem ser evitadas. No entanto, os benefícios da anestesia e os possíveis efeitos em dados derivados de peixes anestesiados devem ser pesados em relação aos resultados obtidos em peixes que não foram anestesiados. (TEMPLE-SMITH, 2018). Segundo Fowler (1995), um dos pontos importantes a ser considerado é a questão sobre qual procedimento produzirá o maior ganho com o menor risco.

Oliveira et al., (2012), afirmaram que os procedimentos devem minimizar a quantidade de tempo de manuseio necessária e reduzir ou eliminar o contato entre o manipulador e o animal. Devem ser considerados sempre os procedimentos mais seguros para o manuseio adequado de raias de água doce durante a obtenção de amostras biológicas, evitando assim a ocorrência de acidentes graves com os ferrões desses animais aquáticos. Considerando-se que não houve diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre as formas de contenção para nenhum dos parâmetros avaliados, nossos resultados nos permitiram concluir que a contenção física para colheita de sêmen por massagem manual, em potamotrigonídeos, foi rápida e efetiva.

A média de tempo para o protocolo de contenção física foi aproximadamente de dois minutos e para o protocolo contenção química em torno de dez minutos, incluindo a sedação total e retorno anestésico. Sendo assim, como o tempo do procedimento com uso do anestésico foi maior e gerou uma maior manipulação nos animais, estabelecemos que o procedimento de colheita de sêmen somente pela contenção física minimizou riscos ao animal e ao manipulador, além ser de baixo custo, pela não utilização do fármaco anestésico, sendo, portanto, um método de escolha para este procedimento.

Em todo o reino animal, incluindo os vertebrados, a estrutura espermática é altamente conservada e consiste em uma cabeça contendo a informação hereditária na forma de DNA, organizada como cromossomos e ordenadamente empacotada no núcleo, que é o principal componente da cabeça. Nos vertebrados, uma peça intermediária ou peça de conexão geralmente prende a cabeça à cauda do espermatozoide ou flagelo. (TEMPLE-SMITH et al., 2018). Assim, a morfologia dos espermatozoides das *P. falkneri* obtidos da colheita de sêmen se apresentaram como em outros elasmobrânquios: com cabeça em hélice e flagelo, corroborando com o descrito por Temple-Smith et al., (2018), que afirmam que em termos de espermatozoides presentes nesta classe, os Chondrictes aparecem como um grupo simples e homogêneo, conforme figura 14.

Figura 14: Imagem de microscopia óptica (aumento 1000 x) de espermatozoides de *P. falkneri*. São Paulo, 2020.



Fonte: Foto do arquivo pessoal de Fabiana Padilha.

Quando colocados os espermatozoides em contato com a água, os mesmos não apresentaram mais motilidade; esses achados também vêm de encontro aos descritos por Dzyuba et al., (2019) que, nos testes de motilidade para espermatozoide de *P. motoro* revelou imobilidade das células e estruturas comprometidas quando em contato com água doce. Diferentemente para espécies de peixes com fecundação externa, como descrita por Maria; Azevedo; Carneiro (2009), que apesar de apresentar grandes diferenças entre algumas espécies, o sêmen da maioria dos peixes possui uma característica em comum que é a ativação da motilidade espermática pela água. A fertilização dos ovócitos somente ocorre após a ativação da motilidade dos espermatozoides que se dará após seu contato com a água.

Há pouca informação disponível sobre a ativação e motilidade dos espermatozoides de elasmobrânquios. Espermatozoides maduros de *H. portusjacksoni* foram ativados por uma solução tamponada com fosfato baseado na composição iônica do sangue elasmobrânquio ou em condições uterinas (DALY, 2008). Para *P. motoro* os espermatozoides móveis são capazes de aumentar sua velocidade sob a influência do fluido uterino no trato reprodutivo feminino (DZYUBA et al., 2019).

Conforme aponta Temple-Smith (2018) existem evidências em muitos estudos sobre espermatozoides mais longos nadarem mais rapidamente. Três princípios básicos que explicam essa percepção incluem: peças maiores com mitocôndrias abundantes alimentando a cinética flagelar; caudas mais longas, gerando modos distintos de propulsão e uma relação cauda / cabeça aumentada, compensando o arrasto da cabeça que afeta a velocidade do espermatozoide. Essas observações incluem: cabeça helicoidal em elasmobrânquios e holocefalia; presença de barbatanas laterais nas caudas do espermatozoide, permitindo cinética aprimorada em peixes ósseos. Entretanto, a duração da motilidade espermática é muito curta na maioria dos peixes de água doce, mas mais longo para peixes marinhos e esturjão (ALAVI et al. 2012).

A análise morfológica tem como objetivo avaliar a integridade das estruturas espermáticas como cabeça, peça intermediária e cauda, tendo em vista a capacidade fertilizante dos espermatozoides e conseqüentemente a fertilidade do sêmen. Qualquer alteração em uma dessas estruturas pode afetar a

funcionalidade do espermatozoide por alterar basicamente a sua capacidade de deslocamento, fecundação e de geração de alevinos viáveis (MARIA et al., 2017).

Foram preparadas lâminas da técnica de eosina - nigrosina para cada amostra, totalizando 30 lâminas, a média de células integras foi de 72,2% para as seis amostras, conforme tabela 4 abaixo.

Tabela 4 - Resultados em percentual da contagem de células do teste de integridade de membrana pela coloração eosina-nigrosina, segundo as amostras avaliadas. São Paulo, 2020.

Amostra	Número de Células (%)	0%	25%	50%	75%	100%
Amostra 1	ÍNTEGRAS	0	26	42	56	63
	LESIONADAS	100	74	58	44	37
Amostra 2	ÍNTEGRAS	0	30	51	63	86
	LESIONADAS	100	70	49	37	14
Amostra 3	ÍNTEGRAS	0	28	45	75	87
	LESIONADAS	100	72	55	25	13
Amostra 4	ÍNTEGRAS	0	26	54	73	93
	LESIONADAS	100	74	46	27	7
Amostra 5	ÍNTEGRAS	0	35	46	65	63
	LESIONADAS	100	65	54	35	37
Amostra 6	ÍNTEGRAS	0	30	42	69	71
	LESIONADAS	100	70	58	31	29

Como resultado é possível identificar dois tipos de célula, as integras, sem coloração - não possuem a membrana plasmática lesada; as lesionadas, pois foi possível a penetração do corante na membrana plasmática, conforme a figura 15.

Figura 15: Célula íntegra sem coloração e célula lesionada com coloração de eosina-nigrosina (Imagem aumentada 1000 X). São Paulo, 2020.

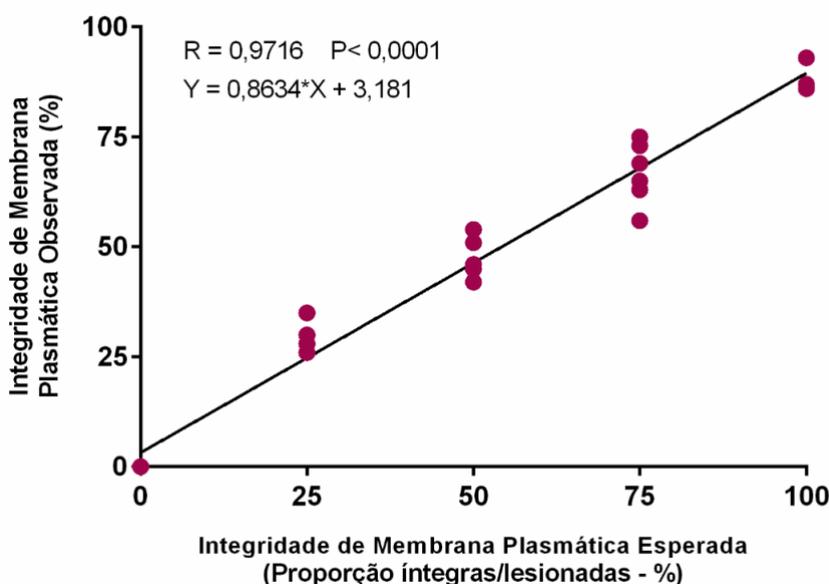


Fonte: Foto do arquivo pessoal de Fabiana Padilha.

Morales-Gamba et al., (2019) em seu estudo com *P. wallacei* concluíram que a baixa porcentagem de células anormais observadas (~ 8%) indicou que o sêmen *in natura* dos machos era de alta qualidade em termos morfológicos, assegurando que os resultados obtidos no presente estudo indicam que os espermatozoides de *P. falkneri* seguem os mesmos padrões.

Tsuneda Junior et al., (2016) concluíram que a técnica de coloração através da eosina e nigrosina, que foi desenvolvida para animais domésticos, pode ser adaptada a espécies silvestres. Portanto a utilização da técnica de eosina-nigrosina mostrou-se eficiente, ao analisarmos uma progressão linear com valor de  $P < 0,0001$  conforme gráfico abaixo, validando o uso do corante eosina – nigrosina para o teste de integridade de membrana de sêmen de raias de água doce.

Gráfico 01: Curva da validação para o teste do corante Eosina-nigrosina. São Paulo, 2020.



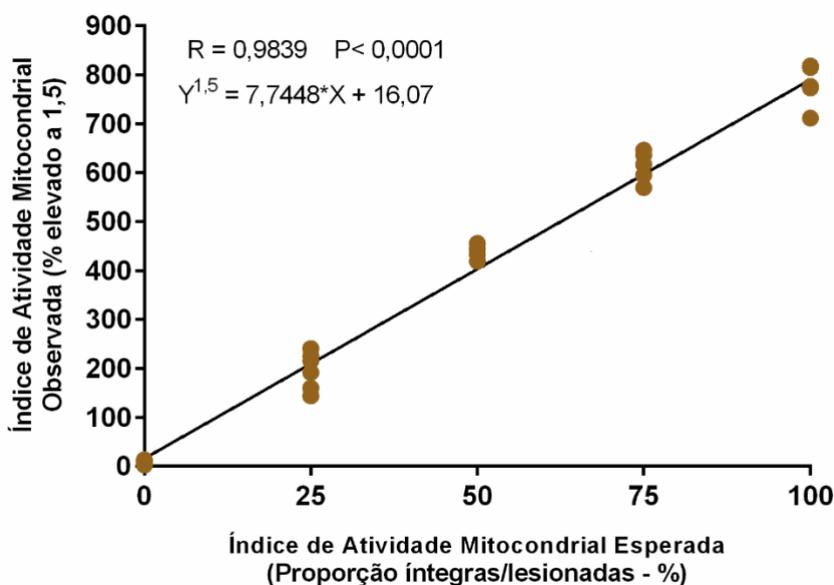
Os resultados da atividade mitocondrial estão apresentados na tabela 5 e gráfico 2; como esperado houve a validação do método proposto por Hrudka (1987), uma vez que a linha é linear progressiva entre o índice de atividade mitocondrial versus o esperado, com  $P < 0,0001$  e índice de atividade citoquímica são similares para todas as amostras, o que evidencia semelhante metabolismo aeróbico dos espermatozoides.

Apesar de não ter sido encontrado dados na literatura publicada integridade da membrana plasmática de espermatozoides em elasmobrânquios, novos estudos são estimulados para a manipulação in vitro para fins de reprodução (MORALES-GAMBA et al., 2019).

Tabela 5 – Resultado da análise das lâminas para o teste DAB, segundo as amostras de *P. falkneri*. São Paulo, 2020.

Amostra	Proporção	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	ÍNDICE
1	100%	78	17	3	2	87.25
	75%	63	22	3	12	74.75
	50%	51	15	3	31	59.25
	25%	14	28	8	55	39.5
	0%	1	4	8	87	5
2	100%	72	24	2	2	84.5
	75%	64	12	3	21	70.75
	50%	52	10	5	33	58.25
	25%	31	10	4	55	38
	0%	1	2	1	16	1.75
3	100%	72	14	3	11	79.75
	75%	66	12	2	20	72.5
	50%	51	11	3	35	57.75
	25%	30	9	6	55	36
	0%	1	0	1	98	125
4	100%	71	16	3	10	79.75
	75%	61	14	3	22	68.75
	50%	49	13	2	36	56
	25%	30	16	3	51	38.75
	0%	2	3	4	91	4.5
5	100%	77	13	3	7	84.25
	75%	70	7	2	21	74
	50%	55	8	1	36	59.25
	25%	31	3	3	63	33.25
	0%	5	1	1	93	5.75
6	100%	80	15	0	5	87.5
	75%	47	27	1	25	60.75
	50%	20	18	4	58	30
	25%	28	2	2	57	29.5
	0%	0	1	2	97	1

Gráfico 02: Curva do Índice de atividade mitocondrial esperada. São Paulo, 2020.



Na preparação da amostra de sêmen para a avaliação morfológica dos espermatozoides geralmente há necessidade do uso de soluções fixadoras para manter inalteradas suas características espermáticas. No preparo dos esfregaços são utilizados corantes específicos que auxiliam a visualização das estruturas espermáticas que são translúcidas (STREIT JÚNIOR et al., 2004; ARRUDA et al., 2011), assim a utilização de corantes como a eosina-nigrosina e o DAB se tornam necessárias para a validação do teste de integridade de membrana em espermatozoides de raias de água doce.

Além disso, essas informações sobre a integridade da membrana plasmática e concentração de espermatozoides servem de base para estudos futuros envolvendo manipulação in vitro de gametas visando o desenvolvimento de protocolos para estabelecimento de um banco de germoplasma. Esses bancos são necessários para fornecer estratégias de manejo adequadas para a conservação de uma espécie com *status* endêmico e alta especificidade de *habitat* (MORALES-GAMBA et al., 2019).

Maria et al. (2010), apresentam que um dos entraves para a comercialização de sêmen de peixes nativos no Brasil é a necessidade de determinação de protocolos eficazes de manipulação e processamento desse material. Para melhorar o processo de desenvolvimento desses protocolos, maior ênfase deve ser dada na padronização das etapas e parâmetros que seguem: colheita e

diluição do sêmen, determinação dos diluentes e crioprotetores, tempo de equilíbrio, taxas de resfriamento e descongelamento e proporção de espermatozoides. Fazendo uma correlação com o presente estudo, destaca-se a importância da padronização dos testes e análise de sêmen de raias do gênero *Potamotrygon*, uma vez que a maioria das metodologias e práticas utilizadas para avaliação andrológica em peixes são baseadas em procedimentos desenvolvidos para mamíferos.

Os resultados deste estudo são pioneiros na coleta de sêmen de raias de água doce por colheita de sêmen pelo método manual, assim, a comparação entre o procedimento de contenção física e química mostrou-se que pode ser um método efetivo para as raias de água doce que apresentam características similares aos animais utilizados neste trabalho.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições deste trabalho nos permitem concluir que:

- A literatura a respeito de colheita e uso de sêmen em *Potamotrygon* ainda é escassa;
- Foi possível validar a colheita de sêmen em *Potamotrygon falkneri*, por massagem manual;
- Não houve diferença estatística na avaliação espermática entre protocolos de contenção física e química;
- Foi possível validar a técnica de integridade de membrana e de atividade citoquímica mitocondrial;
- Este é o primeiro trabalho descrito para colheita de sêmen por meio de massagem manual, com raias *Potamotrygon falkneri* vivas.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que é possível realizar análises espermáticas para as raias de água doce e que a morfologia e características do espermatozoide são homogêneas aos elasmobrânquios, além do que o material ejaculado possui propriedades que o possibilitam ser conservado e futuramente ser empregado em técnicas reprodutivas.

Os benefícios da aplicação desse manejo podem ir além e auxiliar na conservação e disseminação de material genético dos plantéis de *Potamotrygon*, uma vez que a família apresenta características morfológicas similares; sugere-se que o presente estudo seja replicado em outras instituições mantedoras do gênero. Estudos complementares são necessários como a determinação do potencial hidrogeniônico (pH), teste da integridade acrossomal, criopreservação, entre outras técnicas reprodutivas, aliadas à conservação das espécies de raias de água doce e outros elasmobrânquios.

Os esforços de conservação *ex situ* são parte importante de uma estratégia de conservação integrada para proteger as populações *in situ* e principalmente as espécies ameaçadas de raias de água doce.

## REFERÊNCIAS

Referências segundo as normas da FMVZ/USP para Dissertação de Mestrado.

AGUIAR, A. A.; VALENTIN, J. L. Biologia e Ecologia Alimentar de Elasmobrânquios (Chondrichthyes: Elasmobranchii): Uma revisão dos métodos e do estado da arte no Brasil. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 2, p. 464-489, Junho, 2010.

ALAVI, S. M. H.; HATEF, A.; PSĚNICĚKA, M.; KASĚPAR, V.; BORYSHPOLETS, S.; DZYUBA, B.; COSSON, J.; BONDARENKO, V.; RODINA, M.; GELA, D.; LINHART, O. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (II) sperm morphology, acrosome reaction, motility and cryopreservation, **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 22, p. 861–886, jun., 2012.

ARAÚJO, M. L. G. **Biologia Reprodutiva e Pesca de *Potamotrygon* sp. C (Chondrichthyes - Potamotrygonidae), no Médio Rio Negro, Amazonas.** 171 p Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia & Universidade do Amazonas, Manaus, Brasil, 1998.

ARAÚJO, M. L. G., CHARVET-ALMEIDA, P., ALMEIDA, M. P., PEREIRA, H., Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. **Information document AC 20**, p.1-6, 2004

ARRUDA, R. L.; CELEGHINI, E. C.C. ALONSO, M. A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA; L. Z.; NASCIMENTO, J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.145-151, abr./jun., 2011.

BARRETO, R. R.; BORNATOWSKI, H.; MOTTA, F. S.; SANTANDER-NETO, J.; VIANNA, G. M. S.; LESSA, R. P. Rethinking use and trade of pelagic sharks from Brasil. **Marine Policy**, v. 85, p. 114-122, 2017.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa.* **Ames: Iowa State University Press**, 1989, 285p.

BERTOZZO, D.; FREITAS, R. E.; REIS, F.; REIS, R.; SANTOS, D. S.; SOUZA, W. A.; PEREIRA, R. E. P.. Contenção Química em Animais Silvestres Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Garça, Ano VI, n. 11, julho, 2008.

BLUMER, C. G. **Efeito da varicocele na função dos espermatozoides**. 86 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, Brasil, 2009

BRASIL. ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) Saiba mais sobre os Planos de Ação <http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/60-fauna-brasileira/2742-plano-de-acao-nacional-saiba-mais>. Acesso em 23 de novembro de 2018.

BRASIL. ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). Portaria n. 16, 02 de março de 2015. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 04 de março 2015. Seção I.

BRASIL. ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). Instrução Normativa n. 25, 12 de abril de 2012. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 13 DE ABRIL DE 2012. SEÇÃO I.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI-FILHO, E. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 63, p. 472- 481. 2003.

CHARVET-ALMEIDA, P. **Ocorrência, biologia e uso das raias de água doce na baía de Marajó (Pará, Brasil), com ênfase na biologia de *Plesiotrygon iwamae* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae)**. 213 p. Dissertação de Mestrado. Museu Paraense Emílio Goeldi & Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil, 2001.

CHARVET-ALMEIDA, P., ARAÚJO, M. L. G.; ALMEIDA, M. P. Reproductive Aspects of Freshwater Stingrays (Chondrichthyes: Patamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. **Journal of Northwest Atlantic Fishery Science**, v. 35, p. 165-171. 2005.

CONRATH, C. L. Reproductive Biology. In: MUSICK, J. A.; BONFIL, R. **Elasmobranch Fisheries Management Techniques**. Virginia Institute of Marine Science, 2004.

DALY, J. **Development of assisted reproductive technologies in captive fish**. 2008. 175 leaves. Thesis (Ph.D.) (Centre for Reproduction and Development) - Monash University, Australia.

DENT, F.; CLARKE, S. State of the Global Market for Shark Products, **FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper**, n. 590, Rome, 2015.

DULVY, N. K.; HARRISSON, L.R.; CARLSON, J. K.; DAVIDSON, L. N. K.; FORDHAM, S. V.; FRANCIS, M. P. POLLOCK, C.M.; SIMPFENDORFER, C. A.; BURGESS, G.H.; CARPENTER, K. E.; COMPAGNO, L. J. V.; EBERT, D.A.; GIBSON, C.; HEUPEL, M. R.; LIVINGSTONE, S. R.; SANCIANGCO, J. C.; STEVENS, J. D.; VALENTINI, S.; WHITE, W. T. Extinction Risk and Conservation of the World's Sharks and Rays. **Elife** 3:e00590, p. 1-34, 2014.

DZYUBA V.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; KAHANEC, M; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; RODINA, M.; HOLT, W.V.; DZYUBA, B. Sperm motility in ocellate river stingrays: evidence for post-testicular sperm maturation and capacitation in Chondrichthyes. **Journal Zoology**, The Zoological Society of London, n. 307,p. 9–16, ago. (2018), (2019).

DZYUBA, V.; SAMPELS,S.; NINHAUS-SILVEIRA, A; KAHANEC, M; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; RODINA, M.; COSSON, J.; BORYSHPOLETS, S.; SELINGER, M.; STERBA, J.; DZYUBA, B. Sperm motility and lipid composition in internally fertilizing ocellate river stingray *Potamotrygon motoro*. **Theriogenology**, v. 130, p. 26-35, maio, 2019.

FOWLER, M. E. **Restraint and Handling of Wild and Domestic Animals**. Second edition. Iowa State Press a Blackwell Publishing Company.

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, maio, 2010.

GARRONE NETO, D., HADDAD-JUNIOR, V. Acidentes por raias. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S, WEN, F.H., MÁLAQUE, C.M., HADDAD JR, V. (orgs). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2a edição.São Paulo: Editora Sarvier; p. 295-305, 2009.

GARRONE NETO, D.; HADDAD JUNIOR, V.; VILELA, M.J.A.; UIEDA, V.S. Occurrence record of two potamotrigonids species in the Upper Paraná River and some aspects about their biology. **Biota Neotropical**. v. 7, n. 1, jan-apr, 2007.

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**, Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 10, f.1, p. 81-88, mar, 2012.

GASTAL, M. L. Os instrumentos para a conservação da biodiversidade. In: BENSUNSAN, N. (org.). **Seria melhor ladrilhar? Biodiversidade – como, para que, por quê**. Brasília: Editora UnB/ ISA, 2002.

GUIMARÃES, M. A. B. V. Reprodução de animais silvestres. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. Ed. 2. São Paulo: Roca, 2008, p. 161 – 168.

HAMLETT, W. C.; HYSSELL, M. K.; ROZYCKI, T.; BRUNETTE, N.; TUMILTY, K.; HENDERSON, A.; DUNNE, J. Sperm aggregation and spermatozeugmata formation in the male genital ducts in the clearnose skate, *Raja eglantaria*. Indo-Pac, Fish Conference, Nouméa, 1997, Paris, Society, France Ichryoly,p. 281-291, jan, 1999.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10:809, p. 28, 1987.

ICMBio/MMA. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Edição 1. Brasília, DF: ICMBio/MMA, 2018. Volume. P. 492.

LASSO, C. A.; ROSA, R.; MORALES-BETANCOURT, M. A.; GARRONE-NETO, D.; CARVALHO, M.; Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica. Parte II: Colombia, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina. Serie Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia, XV. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, 2016.

LOBODA, T.S.; CARVALHO, M. R. de. Systematic revision of the *Potamotrygon motoro* (Müller & Henle, 1841) species complex in the Paraná-Paraguay basin, with description of two new ocellated species (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology*, p. 693-737, v. 11, n. 4, Porto Alegre, 2013.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F. Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. In: Tavares-Dias, M. Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. Macapá: Embrapa Amapá, 2009, p. 47-63.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; FUJIMOTO, R. Y.; CARNEIRO, P. C. F.; PARDO, J. Q. Protocolo para Avaliação Morfológica de Espermatozoides de Tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Comunicado Técnico Embrapa**. Macapá: Embrapa Amapá, Dezembro, 2017.

MARUSKA, K. P.; GELSLEICHTER, J. Hormones and reproduction in Chondrichthyan fishes. In: Norris, D.O; Lopez, K.H. Hormones and reproduction of vertebrates. San Diego: Academic Press; 2011. p. 209–31.v. 1—fishes

MASUDA, M.; IZAWA, Y.; KAMETSUTA, S.; IKUTA, H.; ISOGAI, T. Artificial insemination of the cloudy catshark. **Journal Japan Association Zoology Gardens Aquariums**, n. 44, p. 39–43, 2003.

MILLER, E.; FOWLER, M. E. **Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine**. Elsevier Health Sciences, 2014. p.792, v. 8.

MORALES-GAMBA, R. D.; CALDAS, J. S.; GODOY, L.; MARCON, J. L. Sperm characterization of the Amazonian freshwater cururu stingray *Potamotrygon wallacei* (Potamotrygonidae): basic knowledge for reproduction and conservation plans. **Zygote, Cambridge University**, p. 1-3, ago, 2019.

MOREIRA, R.; LOBODA, T. S.; CARVALHO, M. R. de.. Comparative anatomy of the clasper of the subfamily Potamotrygoninae (Chondrichthyes: Myliobatiformes). **Journal of Morphology**. v. 279, n.5, p. 1-11, 2018

NEUMANN, Giovano. **Influência da qualidade de imagens e técnicas de rastreamento nos resultados de análise espermática assistida por computador (CASA-Mot) em peixes**. 2019. 72 páginas. Tese (Doutorado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2019.

OLDFIELD, R. G..Biology, husbandry, and reproduction of freshwater stingrays I. **Tropical Fish Hobbyist,v. 53, f. 12, p. 114-116, 2005.**

OLDFIELD, R. G..Biology, husbandry, and reproduction of freshwater stingrays II. **Tropical Fish Hobbyist,v. 54, f. 1, p. 110-112, 2005.**

OLIVEIRA, A. T. de. **Procedimentos de manuseio e de colheita do sangue em arraias de água doce**. Macapá: Embrapa Amapá, 2012. p. 01-22

PENFOLD, L. M.; WYFFELS, J. T. REPRODUCTIVE SCIENCE IN SHARKS AND RAYS. Comizzoli, P.; Brown, J. L.; Holt, W. V. **REPRODUCTIVE SCIENCES IN ANIMAL CONSERVATION**.2 ED. USA: SPRINGER INTERNATIONAL PUBLISHING, 2019. V. 1200, P. 559.

REYNOLDS, J.; HORNBROOK,E.; STETTNER, G.; Terrell, R. Husbandry of freshwater stingrays. In: SMITH, M.; WARMOLTS, D.; THONEY, D.; HUETER, R.;

MURRAY, M.; EZCURRA, J. (editors). 2017. **The Elasmobranch Husbandry Manual II: Recent Advances in the Care of Sharks, Rays and their Relatives**. Special Publication of the Ohio Biological Survey, 2017. p. 99-112.

SANCHES, E. A.; MARCOS, R. M.; BAGGIO, D. M.; TESSARO, L.; BALEN, R. E.; BOMBARDELLI, R. A. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermátocrito. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 6, p. 1163-1167, 2011.

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, Paraná, 2007.

SOLIS-MURGAS, L.D.; FELIZARDO, V.O.; FERREIRA, M.R.; ANDRADE, E.S.; VERAS, G.C. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.186-191, abr./jun.,2011.

SOUZA, A. F. de; ALMEIDA, S. G.; COSTA, L. da; MORAIS, D. B.; MOLINA, W. F.. Diversidade morfológica dos órgãos copulatórios dos vertebrados: uma revisão. **Biota Amazônia**. Macapá, v. 4, n. 4, p. 115-123, 2014

STREIT-JR, D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; SOUZA, E.D.; OLIVEIRA, C.A.L. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Ciências Veterinária e Zootecnia**, UNIPAR, v. 7, n. 2, p. 157-162, jul./dez., 2004.

TASSI, V. de M.; BOLOCHIO, C. E.; CUNHA, I. P.; ASSATO, E. H.; SOUZA, C. A. I. de; MAGALHÃES, F. de C.; MACHADO, C. S.; CELEGHIN, P. C. **Manual para tratadores – Zoológico de Guarulhos**. Guarulhos: Prefeitura de Guarulhos/Secretaria de Meio Ambiente. P. 15-17.2008.

TEMPLE-SMITH, P. D.; RAVICHANDRAN, A.; HORTA NUNEZ, F. E. Sperm: Comparative Vertebrate. In: SKINNER, M. K. (Ed.). **Encyclopedia of Reproduction**. Academic Press: Elsevier. pp. 210–220, v. 6, 2018.

The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 10 June 2019.

TSUNEDA, P.P.; DUARTE JUNIOR, M. F.; SILVA, L. E. S.; JORGE, A. A.; ZERVOUDAKIS, L. K. H.; DA PAZ, R. C. R.. Análise seminal e padronização da coloração eosina-nigrosina em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3-4, p. 198-201, jul./dez., 2015.

VALENTIM, F. C. de S.. **Citotaxonomia de arraias de água doce (Myliobatiformes, Potamotrygonidae) da bacia Amazônica Central**. 77 páginas. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) – Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas, Manaus, 2011.

VASCONCELOS, Huann Carillo Gentil; OLIVEIRA, Júlio César Sá de. Alimentação de *Potamotrygon motoro* (CHONDRICHTHYES, POTAMOTRYGONIDAE) na planície de inundação da APA do Rio Curiaú, Macapá-Amapá-Brasil. **Biota Amazônia**. p. 66-73, v. 1, n. 2, Macapá, 2011.

VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO, H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiol Biochem**, v.35, p.137-150, 2008.

WOSNICK, N.; NUNES, A. R. O. P.; FEITOSA, L. M.; NUNES, J..Revisão sobre a diversidade, ameaças e conservação dos elasmobrânquios do Maranhão. In: OLIVEIRA JUNIOR, J. M. B. de; CALVÃO, L. B. **Tópicos Integrados de Zoologia**. Ponta Grossa/Paraná: Atena Editora, 2019. p. 44-54. 2019.