

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Fabiana Lúcia André Padilha

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

### Abstract

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: (A) physical restraint (net), and (B) chemical restraint (3mg / kg propofol, directly into the gills). The protocols were alternated between the two groups in a 30-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; A:  $4.76 \pm 0.95$ ; B:  $3.41 \pm 0.95$ ); concentration (in 10<sup>6</sup>/mL; A:  $929.50 \pm 70.97$ ; B:  $1.071.67 \pm 108.82$ ); vigor (scale 0 to 5; A:  $2.34 \pm 0.17$ ; B:  $2.83 \pm 0.16$ ); total motility at time 0 (in %; A:  $57.50 \pm 6.55$ ; B:  $62.50\% \pm 5.28$ ); total motility ( $51.83\% \pm 7.12$  vs.  $53.67\% \pm 6.12$ ) and progressive motility (in %; A:  $13.67 \pm 1.71$ ; B:  $10.67 \pm 1.12$ ) 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*.

Key-words: Elasmobranch; Reproduction, Semen; *Potamotrygon falkneri*

## Resumo

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 cativeiro. Utilizamos 6 exemplares machos, adultos de *Potamotrygon falkneri*, mantidos sob os cuidados do Aquário de São Paulo, Brasil. Os animais foram divididos em dois grupos (A e B) que se alternaram, com intervalo de 50 dias, para a realização de dois protocolos de colheita de sêmen distintos: através 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 ( $4.76 \text{ mL} \pm 0.95$  vs.  $3.41 \text{ mL} \pm 0.95$ ), concentração ( $929.50 \text{ spz} \times 10^6/\text{mL} \pm 70.97$  vs.  $1,071.67 \text{ spz} \times 10^6/\text{mL} \pm 108.82$ ), vigor (0-5 escala;  $2.34 \pm 0.17$  vs.  $2.83 \pm 0.16$ ), motilidade total no tempo 0, logo após a coleta ( $57.50\% \pm 6.55$  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 nos 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*.