

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL - UERGS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, ÊNFASE EM BIOLOGIA
MARINHA**

MARINA LOUREIRO ARAUJO

**CARACTERIZAÇÃO ESPERMÁTICA DE *Dasyatis hypostigma* (SANTOS E
CARVALHO, 2004): IDENTIFICAÇÃO DO PERÍODO REPRODUTIVO DE
INDIVÍDUO MANTIDO SOB CUIDADOS PROFISSIONAIS**

**OSÓRIO
2023**

MARINA LOUREIRO ARAUJO

CARACTERIZAÇÃO ESPERMÁTICA DE *Dasyatis hypostigma* (SANTOS E CARVALHO, 2004): IDENTIFICAÇÃO DO PERÍODO REPRODUTIVO DE INDIVÍDUO MANTIDO SOB CUIDADOS PROFISSIONAIS

Monografia apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, ênfase em Biologia Marinha e Costeira na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, convênio Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Ênio Lupchinski Júnior
Coorientador: Dr. Federico Argemi

OSÓRIO

2023

Catálogo de Publicação na Fonte

A663c Araujo, Marina Loureiro.

Caracterização espermática de *Dasyatis hypostigma* (SANTOS e CARVALHO, 2004): identificação do período reprodutivo de indivíduo mantido sob cuidados profissionais. / Marina Loureiro Araujo. – Osório, 2023.

32 f. il.

Orientador: Ênio Lupchinski Júnior.

Coorientador: Federico Argemi.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso de Ciências Biológicas: ênfase em Biologia Marinha, Unidade Litoral Norte-Osório, 2023.

1. Raias. 2. Morfologia. 3. Esperma. 4. Reprodução. I. Júnior, Ênio Lupchinski. II. Argemi, Federico. III. Título.

MARINA LOUREIRO ARAUJO

CARACTERIZAÇÃO ESPERMÁTICA DE *Dasyatis hypostigma* (SANTOS E CARVALHO 2004): IDENTIFICAÇÃO DO PERÍODO REPRODUTIVO DE INDIVÍDUO MANTIDO SOB CUIDADOS PROFISSIONAIS

Monografia apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, ênfase em Biologia Marinha e Costeira na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, convênio Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Ênio Lupchinski Júnior
Coorientador: Dr. Federico Argemi

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Doutoranda Nathália dos Santos Teixeira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr Paulo Henrique Ott
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

Prof^aDr^a Ester Wolff Loitzenbauer
Coordenadora da atividade
Trabalho de conclusão II – CBM

OSÓRIO

2023

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais que me deram todo o apoio desde sempre para que eu pudesse me fazer presente na universidade, suprindo todas as minhas necessidades e sempre me erguendo para que eu nunca desistisse.

Ao meu namorado, Bruno, meu parceiro de vida que está sempre me incentivando e exaltando a profissão linda que escolhi para minha vida.

Ao meu orientador Lupi, agradeço por toda ajuda desde o início e por não ter desistido dessa ideia louca, me apoiado em todos os momentos mesmo quando as coisas não estavam saindo como planejávamos. Serei eternamente grata à essa orientação, que só demonstra o profissional excelente que é.

À equipe do Oceanic Aquarium, principalmente ao meu co-orientador Federico, agradeço por terem sempre me recebido de braços abertos e dispostos a me ajudar durante as coletas.

Ao pessoal do LAB AQUAM por me ajudarem a iniciar esse projeto e dar todo suporte necessário.

Aos meus amigos, Bianca, Laura, João Pedro, Grazi, João, Canaã, Josi, Kivya, Pâmela, João Luís, Minuche, Luana e Tiffany, pelo apoio e palavras de consolo sempre que precisei.

Às biólogas da minha vida Duda, Vivi, Nélida e Mônica.

Aos Biólogos que conheci durante minha trajetória como estudante, Ju e Pedro.

À UERGS por prestar todo o apoio necessário e facilitar a utilização do laboratório para análise das amostras.

À todos citados, minha imensa gratidão, pois apesar de todas as dificuldades, um pouquinho de cada um foi o suficiente para que esse trabalho fosse finalizado.

RESUMO

A espécie *Dasyatis hypostigma*, pertence à Subclasse Elasmobranchii e Ordem Myliobatiformes, apresenta características exclusivas que a diferem das outras espécies do gênero *Dasyatis*, como a presença de um sulco sinuoso em forma de W, a superfície dorsal do disco quase inteiramente nua, não apresentando denticulos, espinhos ou tubérculos alargados, focinho levemente saliente e diferenças nas dobras caudais. A análise da morfologia espermática possibilita se compreender a biologia reprodutiva das espécies, trazendo informações importantes para o auxílio na preservação das espécies ameaçadas. Os elasmobrânquios são predadores de topo e contribuem positivamente para o equilíbrio do ecossistema marinho. No entanto, por conta de suas estratégias reprodutivas, acabam sendo alvo da atividade pesqueira, sendo um impacto relevante, sobretudo para espécies que possuem população com distribuição geográfica restrita. Tendo em vista que a espécie objeto deste estudo se encontra ameaçada de extinção, o objetivo principal foi analisar a morfologia espermática para assim entender e identificar o período reprodutivo de *D. hypostigma* quando mantida sob cuidados profissionais a fim de criar subsídios para um futuro plano de manejo e conservação para esta espécie. Os resultados indicaram um pico reprodutivo indicado pelas coletas nos meses de Julho de 2022 e Fevereiro de 2023, com sêmen de boa qualidade apresentando percentual de células anormais menor que 30% e sucesso reprodutivo garantido. As anomalias observadas em cada coleta podem ser em decorrência tanto da manipulação do esperma, que após fixado causa morte imediata das células, bem como durante o processo de espermatogênese. No entanto a quantidade de espermatozoides normais nas amostras prevaleceu em todas as coletas ($74,25 \pm 7,97$), e, apesar do número de anormalidades houve sucesso reprodutivo com o nascimento de uma prole saudável, sugerindo que o esperma apresenta boa qualidade e quantidade de espermatozoides viáveis para uma possível reprodução em cativeiro.

Palavras-chave: raias. morfologia. esperma. reprodução.

ABSTRACT

The species *Dasyatis hypostigma*, belongs to the Subclass Elasmobranchii and Order Myliobatiformes, presents exclusive characteristics that differentiate it from the other species of the genus *Dasyatis*, such as the presence of a sinuous groove in the form of a W, the dorsal surface of the disc almost entirely bare, without denticles, enlarged spines or tubercles, slightly protruding snout and differences in the caudal folds. The analysis of sperm morphology makes it possible to understand the reproductive biology of the species, bringing important information to aid in the preservation of endangered species. Elasmobranchs are top predators and contribute positively to the balance of the marine ecosystem. However, due to their reproductive strategies, they end up being the target of fishing activities, with a relevant impact, especially for species that have a population with a restricted geographic distribution. Bearing in mind that the species object of this study is endangered, the main objective was to analyze the sperm morphology in order to understand and identify the reproductive period of *D. hypostigma* when kept under professional care in order to create subsidies for a future plan of management and conservation for this species. The results indicated a reproductive peak indicated by collections in the months of July 2022 and February 2023, with good quality semen showing a percentage of abnormal cells lower than 30% and guaranteed reproductive success. The anomalies observed in each collection may be due both to the manipulation of the sperm, which after fixed causes immediate death of the cells, as well as during the process of spermatogenesis. However, the amount of normal spermatozoa in the samples prevailed in all collections (74.25 ± 7.97), and, despite the number of abnormalities, there was reproductive success, with the birth of healthy offspring, suggesting that the sperm has good quality and quantity of viable spermatozoa for possible reproduction in captivity.

Keywords: rays. morphology. sperm. reproduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visualização do sulco sinuoso em forma de W, característico para espécie.	14
Figura 2 - Área de distribuição da espécie <i>Dasyatis hypostigma</i>	15
Figura 3 - Mapa da área de estudo, indicando a localização do Oceanic Aquarium, onde as amostras foram colhidas.....	17
Figura 4 - Procedimentos da colheita; A) Manejo do indivíduo; B) Colheita do esperma;	18
Figura 5 - Manejo do animal para a biometria; A) Comprimento do disco do indivíduo sendo mensurado; B) Massa sendo aferida	19
Figura 6 - Esperma in natura, coleta de Julho de 2022, visível quantidade de esperma	19
Figura 7 - Esperma colhido em Novembro de 2022, volume visível de esperma.	20
Figura 8 - Esfregaços para visualização dos espermatozoides corados.	21
Figura 9 - Visão geral do espermatozóide	22
Figura 10 - Espermatozoides normais e anormais (40x); A) morfologicamente normal (40x); B) defeitos na cabeça e flagelo dobrado (40x); C) dobra da bainha citoplasmática (40x); D) flagelo dobrado (40x); E) flagelo enrolado (40x); F) vista geral de espermatozóides (10x).	26
Figura 11 - A) Aumento de volume na região dorso-caudal; B) Aumento de volume na cavidade celomática	27
Figura 12 - Neonatos da raia-manteiga, no setor de quarentena	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVOS	11
1.1.1 OBJETIVO GERAL.....	11
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 CHONDRYCHTHYES – OS PEIXES CARTILAGINOSOS.....	11
2.2 ATIVIDADE PESQUEIRA COMO FATOR DE RISCO PARA ESPÉCIES DE ELASMOBRÂNQUIOS.....	13
2.3 A ESPÉCIE <i>DASYATIS HYPOSTIGMA</i> (SANTOS & CARVALHO, 2004)	14
2.4 CICLO REPRODUTIVO DOS MACHOS E MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 ÁREA DE ESTUDO	16
3.2 MANUTENÇÃO DO INDIVÍDUO NO AQUÁRIO.....	17
3.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	28

1. INTRODUÇÃO

A Subclasse Elasmobranchii, pertence à Classe Chondrichthyes, é constituída por tubarões e raias (COMPAGNO, 2005) distribuídos em todos os oceanos, em águas tropicais, subtropicais, temperadas e frias, sendo animais predominantemente marinhos com algumas espécies que utilizam regiões estuarinas como áreas de berçário e/ou alimentação. Ademais, podem ser encontrados desde águas rasas como costões rochosos, até recifes de corais e regiões abissais (COMPAGNO, 1984). Por certo, espécies de elasmobrânquios possuem papel ecológico fundamental para a manutenção do equilíbrio do ecossistema marinho, por serem predadores de topo da cadeia alimentar, uma vez que consomem grande diversidade de organismos marinhos (VOOREN, 2005). No entanto, estas espécies sofrem para manter suas populações por conta do seu longo ciclo de vida, crescimento lento, maturação tardia e baixa taxa de fecundidade (BORNATOWSKI, 2012), sendo essas características de espécies conhecidas como “K estrategistas”, ou seja, espécies que investem mais energia no crescimento ao longo da vida e no tamanho corporal, possuem proles pouco numerosas e estão predominantemente ligadas a ambientes mais estáveis e com competição elevada (HAMLETT, 2005).

Essas características somadas à vulnerabilidade em decorrência da atividade pesqueira constituem um fator preocupante frente à mortalidade excessiva de indivíduos capturados por redes de pesca (DULVY *et al.*, 2008), a qual acaba por dificultar uma possível reposição populacional, tornando inconveniente tal estratégia quando se considera uma certa faixa etária que inclua indivíduos recrutas.

A pesca intensiva é considerada o principal fator de ameaça às espécies de elasmobrânquios, ao passo que ocorre de maneira significativa, capaz de reduzir consideravelmente o crescimento de populações, visto que, a captura de fêmeas adultas reduz o número de neonatos que a população poderia produzir, da mesma maneira que a captura de indivíduos juvenis e neonatos reduz a capacidade de desenvolvimento de novas fêmeas reprodutoras na população (VOOREN & KLIPPEL, 2005). Por isso, espécies que possuem populações residentes, ou seja, realizam todo o seu ciclo de vida dentro de uma área geográfica restrita tendem a estar em substancial declínio e se tornarem ameaçadas de extinção (VOOREN & KLIPPEL, 2005); como as espécies *Pseudobatos horkelii*, *Mustelus fasciatus*,

Hypanus dipterurus e *Squatina oculata*, as quais estão classificadas como “em perigo” de acordo com a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (IUCN, 2020).

Segundo dados de 2018 do Ministério do Meio Ambiente (MMA), o Brasil possui uma Zona Costeira de aproximadamente 8.500 km dispostos em 17 estados com municípios que vêm sofrendo demasiadamente com o processo de urbanização, crescimento populacional humano, e, conseqüentemente, ameaçando a fauna costeira suscetível à pesca, degradação e poluição do ambiente (DULVY *et al.*, 2008).

Devido ao déficit de estudos relacionados às espécies de raias, há poucos planos de manejo e diretrizes para conservação de espécies ameaçadas, levando-se em consideração as características dos indivíduos como comportamento migratório, que por sua vez dificultam a implementação de um plano de manejo eficiente para a maioria das espécies (DENT & CLARKE, 2015). Diante disso, a falta de estratégias de manejo efetivas para a conservação de elasmobrânquios leva a uma preocupação com o sucesso reprodutivo das diversas espécies, ressaltando-se, assim, a necessidade de reprodução em cativeiro como uma ferramenta de preservação para as espécies ameaçadas (PITNICK *et al.*, 2009).

Indivíduos de vida livre precisam lidar com diversas situações que alteram o seu ciclo de vida para que seja realizada a seleção natural, onde sofrem pressões pelas variáveis ambientais, como variações de temperatura, salinidade, qualidade da água e procura por recursos alimentares. Todos esses fatores alteram o funcionamento do organismo dos indivíduos modificando seu ciclo reprodutivo de maneira a interferir no desenvolvimento das células espermáticas, contribuindo negativamente para o seu sucesso reprodutivo (PITNICK *et al.*, 2009). Sendo assim, o principal fator a ser levado em conta, tratando-se de reprodução assistida, é a qualidade dos gametas, que por não sofrerem variações ambientais quando mantidas sob cuidados profissionais, tem mais chance de sucesso na reprodução (PITNICK *et al.*, 2009).

Um dos parâmetros analisados para se avaliar a qualidade espermática é a morfologia do espermatozoide, na qual se investiga a ocorrência de células normais e anormais, caracterizando-se assim a fertilidade do indivíduo.

Frente ao exposto, e considerando a falta de literatura disponível sobre a espécie *Dasyatis hypostigma*, o presente estudo visa descrever, de forma simplificada, a morfologia espermática de um macho adulto de raia-manteiga, a fim

de se identificar a ocorrência de picos reprodutivos para fins de conservação da espécie, tendo em vista a permanência do indivíduo em cativeiro com condições ambientais estáveis.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a morfologia espermática de um indivíduo de raia-manteiga *Dasyatis hypostigma*.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a morfologia dos espermatozoides de *D. hypostigma*;
- Identificar a presença de patologias nos espermatozoides;
- Quantificar as patologias encontradas nos espermatozoides;
- Comparar a existência de diferenças sazonais entre as amostras colhidas em diferentes épocas do ano;
- Identificar a presença de picos reprodutivos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CHONDRYCHTHYES – OS PEIXES CARTILAGINOSOS

A palavra chondrichthyes do grego *chondros* = cartilagem e *ichthyes* = peixes, remete a uma das principais características desses animais, o esqueleto cartilaginoso. Essa classe é dividida em duas subclasses, os Elasmobranchii que englobam os tubarões e raias e os Holocephali constituído pelas quimeras (GOMES et. al., 2010). O grupo abrange cerca de 1.250 espécies distribuídas no mundo todo (WEIGMANN, 2016) sendo considerado atualmente como um dos grupos vivos de

vertebrados mandibulados mais antigos, que divergiram dos peixes ósseos há cerca de 450 milhões de anos (FIGUEIREDO, 1977; COMPAGNO, 1999).

A ausência da bexiga natatória nos Chondrichthyes é uma das principais características que diferencia os peixes cartilaginosos dos peixes ósseos. Ademais, o fígado desses animais é altamente adaptado com função semelhante à da bexiga natatória, pois atua no armazenamento de energia convertida em um óleo com densidade menor que a da água, o que auxilia na natação e flutuabilidade neutra do animal. Sendo assim, os mecanismos de absorção e acúmulo de energia os ajudam a garantir sua posição na coluna d'água (POUGH; JANIS; HEISER, 2003).

O grupo possui ainda outras características biológicas que os diferenciam dos peixes ósseos, tais como: crânio formado por uma única peça esquelética, sem estruturas; órgãos copulatórios dos machos modificados a partir de nadadeiras pélvicas conhecidas como cláspers; revestimento da pele composto por placas dérmicas ou escamas placóides; número variável de fendas branquiais (FIGUEIREDO; WOURMS, 1977). Os Chondrichthyes apresentam, ainda, fecundação interna, que ocorre através da introdução do cláspers no oviduto da fêmea, onde acontece a liberação do esperma (WOURMS, 1977; COMPAGNO, 1999).

Os elasmobrânquios possuem estratégias reprodutivas que se diferenciam entre as espécies, as quais estão relacionadas com seu ciclo de vida em geral e são classificadas quanto ao desenvolvimento do embrião (CASTRO, 2004); divididas em ovíparas e vivíparas, sendo essa última subdividida quanto ao modo de nutrição dos embriões. Nas espécies ovíparas os embriões se desenvolvem em cápsulas ovígeras fora do corpo da fêmea e se mantêm vulneráveis até o momento da eclosão; diferentemente das espécies vivíparas, nas quais os embriões se desenvolvem dentro da fêmea até o momento do nascimento. A viviparidade é considerada uma estratégia reprodutiva dominante entre os elasmobrânquios (WOURMS, 1977).

Destacam-se ainda outras características dos elasmobrânquios quanto às suas adaptações, como a presença de espiráculos, aberturas próximas aos olhos, que auxiliam na respiração e são uma ferramenta de adaptação de extrema importância principalmente para espécies com hábitos sedentários (WOURMS, 1977; GOMES et.al., 2010); as ampolas de Lorenzini, que são estruturas sensíveis localizadas na região cefálica que atuam como eletrorreceptores funcionando como

um radar na detecção de suas presas através da bioeletricidade emitida por elas (COLIN, 2007).

2.2 ATIVIDADE PESQUEIRA COMO FATOR DE RISCO PARA ESPÉCIES DE ELASMOBRÂNQUIOS

A pesca intensiva contribui consideravelmente para a redução de populações de elasmobrânquios como um dos principais problemas para a conservação dos mesmos, visto que a dinâmica utilizada para sobrevivência, bem como as estratégias reprodutivas adotadas, envolvem um lento crescimento populacional, e, conseqüentemente, baixa produtividade de estoque. Sendo assim, um número elevado de capturas destes animais acabam por exceder o rendimento sustentável e resultam em um declínio progressivo da população, podendo em alguns casos resultar na extinção de populações regionais. Deste modo, espécies com populações residentes, que ocupam uma área geográfica restrita, encontram-se extremamente vulneráveis à atividade pesqueira (VOOREN & KLIPPEL, 2005).

Tubarões e raias vêm enfrentando problemas com a atividade pesqueira desde a década de 1980, tendo como justificativa o valor comercial da carne desses animais e a diminuição de capturas tradicionais de peixes ósseos pela alta demanda. Com isso, os problemas de sobrepesca começaram a se tornar preocupantes diante do cenário de poucos recursos aliados à alta demanda (VOOREN & KLIPPEL, 2005).

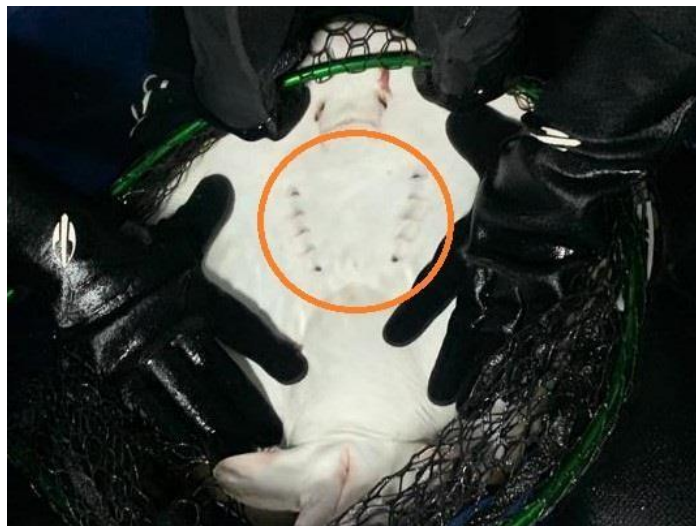
Segundo dados da FAO (SOFIA, 2022), a fração dos estoques pesqueiros dentro de níveis biologicamente sustentáveis diminuiu para 64,6% em 2019, 1,2% menor do que em 2017 e os estoques biologicamente sustentáveis representaram 82,5% dos desembarques de 2019 dos estoques avaliados pela FAO. Por isso, como a pesca é o principal fator antrópico que afeta as populações de tubarões e raias, planos de manejo e conservação das espécies de elasmobrânquios como componentes da biodiversidade têm chamado cada vez mais a atenção de organizações envolvidas com a gestão pesqueira, alertando para que haja um controle rigoroso desta atividade (VOOREN & KLIPPEL, 2005).

2.3 A ESPÉCIE *DASYATIS HYPOSTIGMA* (SANTOS & CARVALHO, 2004)

A Família Dasyatidae, pertencente à Ordem Myliobatiformes, engloba 70 espécies divididas entre 6 gêneros: *Taeniura*, *Himantura*, *Pastinachus*, *Urogymnus*, *Pteroplatytrygon* e *Dasyatis* (BIGELOW & SCHROEDER, 1953; SANTOS & CARVALHO, 2004). A principal característica dessa ordem de rajiformes é uma cauda longa com ferrão (COMPAGNO, 1999), de outra forma, as raias possuem estratégias reprodutivas variadas. Os indivíduos da Família Dasyatidae utilizam como estratégia reprodutiva a viviparidade matotrófica aplacentária, na qual o embrião recebe nutrientes através de vilosidades, também chamadas de trofonemas (WOURMS, 1977).

Popularmente conhecida como raia-manteiga, a *Dasyatis hypostigma* é uma raia costeira demersal, de águas subtropicais e temperadas e pode habitar desde águas rasas com cerca de 5 metros até 80 metros de profundidade (FISHBASE, 2022). Esta espécie foi tratada por muitos anos como *Dasyatis say*; no entanto, observaram-se alguns indivíduos com características morfológicas distintas, tais como: a presença de um sulco sinuoso em forma de W (Figura 1) sobre a barra coracóide, logo abaixo e no meio das fendas branquiais; a superfície dorsal do disco quase inteiramente nua, não apresentando dentículos, espinhos ou tubérculos alargados; focinho levemente saliente; diferenças nas dobras caudais. Estas observações levaram à descrição de uma nova espécie em 2004, a *Dasyatis hypostigma* (SANTOS & CARVALHO, 2004).

Figura 1 - Visualização do sulco sinuoso em forma de W, característico para espécie.



Fonte: Autora (2022)

A espécie *D. hypostigma* ocorre desde o Espírito Santo até o sul do Rio Grande do Sul, podendo ocorrer também ao sul de Mar Del Plata, na Argentina. O padrão de distribuição desta espécie sugere um certo grau de endemismo e representa fator de risco, uma vez que por habitar águas mais rasas, torna-se vulnerável às atividades pesqueiras, podendo ser capturada com mais frequência em redes-de-emalhar e redes camaroneiras (INSTITUTO CHICO MENDES , 2016).

Figura 2 - Área de distribuição da espécie *Dasyatis hypostigma*.



Fonte: FishBase (2022)

2.4 CICLO REPRODUTIVO DOS MACHOS E MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Na maioria dos elasmobrânquios, o ciclo reprodutivo dos machos é anual e está intimamente relacionado ao ciclo reprodutivo das fêmeas, de maneira a reservar quantidades adequadas de esperma até o período de ovulação da fêmea (WOURMS, 1977). A espécie *D. hypostigma* apresenta fecundação interna, que ocorre através da introdução do cláspere no oviduto da fêmea, onde acontece a liberação do esperma (COMPAGNO, 1999; WOURMS, 1977).

A morfologia espermática é um dos fatores que mais influencia na taxa de fertilização do sêmen, tendo em vista a integridade funcional do espermatozoide. Ao analisar a morfologia do esperma, leva-se em conta a presença de patologias primárias (flagelo dobrado, cabeça isolada e gotas citoplasmáticas) e secundárias (quebra e degeneração do espermatozoide e flagelo enrolado). Patologias primárias podem ocorrer durante o processo de espermatogênese e patologias secundárias estão relacionadas a fatores ambientais, situações de estresse e manuseio do esperma (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2012).

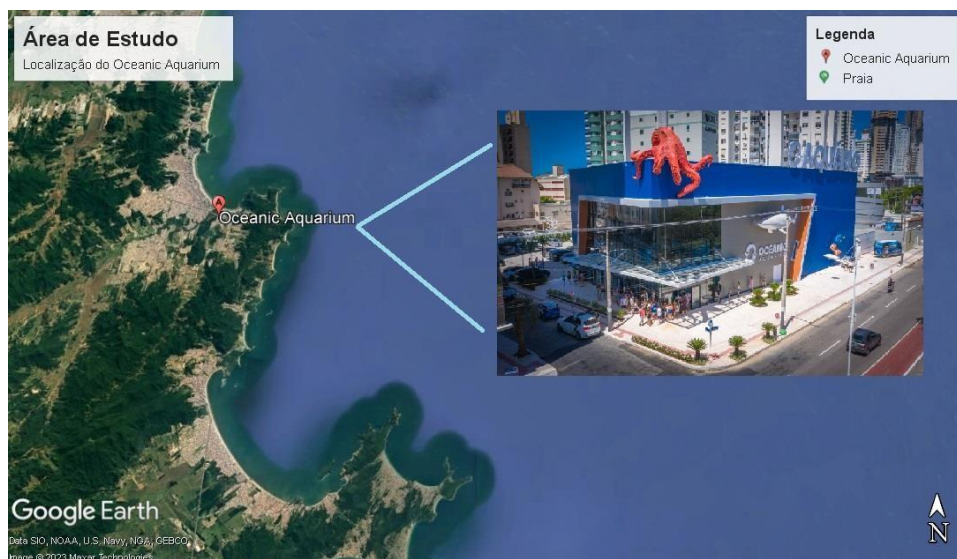
A morfologia espermática de *D. hypostigma* é importante para se entender a biologia reprodutiva da espécie, bem como para o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida em espécies de raias e outros peixes cartilagosos ameaçados de extinção. Estas informações serviriam como base para estudos futuros visando a investigação com maiores detalhes da morfologia espermática de *D. hypostigma* e sua biologia reprodutiva (WALLER, COLLINS & WEIGMANN, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado no Oceanic Aquarium, localizado no Município de Balneário Camboriú, no Litoral Norte de Santa Catarina, situado nas coordenadas geográficas 26° 59' 28" S e 048° 38' 7" O (CIDADE BRASIL, 2022). O Oceanic Aquarium foi aberto ao público no dia 30 de Dezembro de 2019 e, desde então, recebe turistas durante o ano todo, buscando sempre fornecer aos seus visitantes uma conexão com a biodiversidade aquática através de programas de educação ambiental e visitas guiadas, promovendo assim uma reflexão acerca da importância dos animais abrigados e seus habitats, contribuindo para a conscientização da população sobre preservação e sustentabilidade. Além disso, o aquário abriga mais de 140 espécies de animais marinhos e de água doce, dispostos em uma área construída de 3.500 m² contendo cerca de 1.000.000 de litros de água (OCEANIC AQUARIUM, 2019).

Figura 3 - Mapa da área de estudo, indicando a localização do Oceanic Aquarium, onde as amostras foram colhidas.



Fonte: Autora (2023)

3.2 MANUTENÇÃO DO INDIVÍDUO NO AQUÁRIO

O indivíduo utilizado neste estudo é um macho adulto saudável, mantido em um aquário em condições teoricamente semelhantes ao habitat natural. A alimentação do indivíduo é realizada duas vezes ao dia quando lhe é ofertado exclusivamente camarão, manjuba, sardinha e lula; mas também acaba por aproveitar os alimentos ofertados aos outros animais que compartilham o mesmo recinto. No aquário são utilizadas luzes brancas do tipo HQI e luzes azuis do tipo LED, os níveis de salinidade se mantêm entre 29 e 31 PSU, a temperatura da água varia entre 22°C e 23°C e o pH da água varia entre 7,8 e 8,0; condições tipicamente marinhas.

3.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS

As coletas foram realizadas durante as quatro estações do ano: Abril/2022, Julho/2022, Novembro/2022 e Fevereiro/2023. O procedimento de colheita envolveu

a aplicação de uma pequena pressão na região ventral próxima à vesícula seminal do indivíduo para a liberação do esperma pela cloaca (Figura 4), então, fez-se possível o recolhimento da amostra de esperma com o auxílio de uma seringa descartável de 3 ml de volume.

Figura 4 - Procedimentos da colheita; A) Manejo do indivíduo; B) Colheita do esperma;



Fonte: autora (2022)

O esperma foi então transferido para um Eppendorf® de 1,5 ml sendo fixado em solução salina tamponada para a preservação da amostra, e, após, mantido em refrigeração para as análises a posteriori.

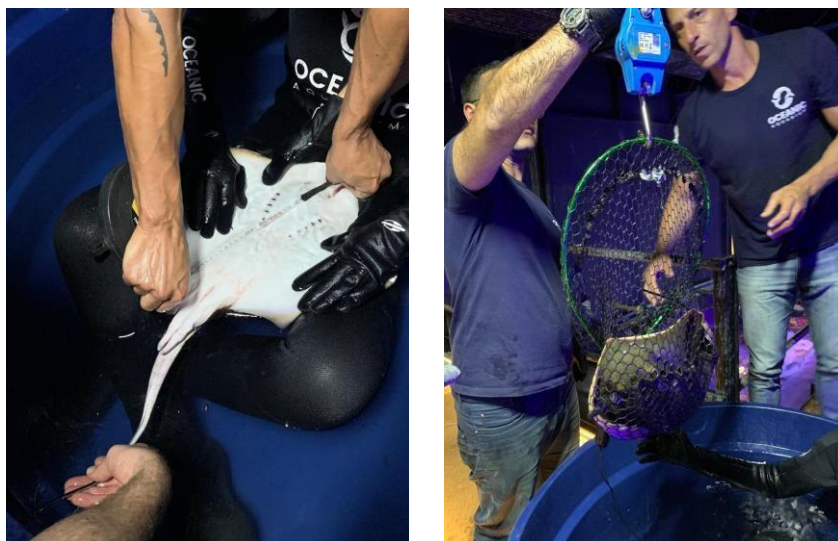
Após a colheita do esperma, foram aferidas as medidas morfométricas e a massa corpórea do animal, obtendo-se as medidas representadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Dados morfométricos e peso do indivíduo.

PESO (Kg)	COMPRIMENTO TOTAL (cm)	COMPRIMENTO DO DISCO (cm)	LARGURA DO DISCO (cm)	COMPRIMENTO DO CLÁSPER (cm)
4,2	42	39	43	11

Fonte: Autora (2022)

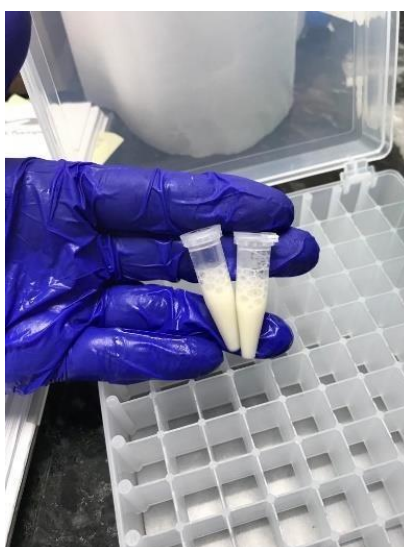
Figura 5 - Manejo do animal para a biometria; A) Comprimento do disco do indivíduo sendo mensurado; B) Massa sendo aferida.



Fonte: Autora (2022)

A primeira coleta foi realizada em Abril de 2022, quando foi colheitado cerca de 1,0 ml de esperma, já em Julho de 2022 foi colheitado cerca de 2 ml de sêmen, fato que chamou a atenção pela evidente maior quantidade de esperma produzida no mês de Julho. Após a colheita, as amostras de sêmen in natura (Figura 6) foram divididas para utilização em outras análises e estudos, e então foram separados 50 μ l de sêmen destas amostras e adicionados 1000 μ l de solução salina tamponada de formaldeído a 10%, para o presente ensaio.

Figura 6 - Esperma in natura, coleta de Julho de 2022, visível quantidade de esperma.



Fonte: Autora (2022)

As coletas seguintes foram realizadas nos meses de Novembro de 2022, sendo colheitado cerca de 2,0 ml de esperma (Figura 7) e 0,3 ml de esperma em Fevereiro de 2023; realizando-se o mesmo procedimento de fixação das amostras nas proporções de 50 μ l de sêmen para 1000 μ l de formaldeído tamponado na amostra de Novembro de 2022, e 100 μ l de sêmen para 900 μ l de formol tamponado na amostra de Fevereiro de 2023.

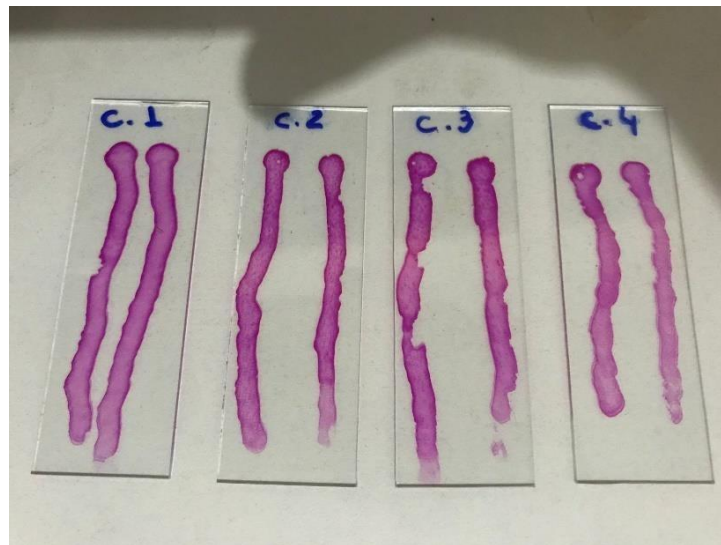
Figura 7 - Esperma colheitado em Novembro de 2022, volume visível de esperma.



Fonte: Autora (2022)

Novas soluções foram preparadas para a produção dos esfregaços, nas proporções de 2 μ l da amostra fixada para 100 μ l de formol, e, a partir de então, 30 μ l dessa nova solução foi misturada a 5 μ l de corante Rosa Bengala (Maria et al., 2012). Após, foram pipetadas duas gotas de 15 μ l da amostra corada em uma lâmina para a observação dos espermatozoides em um microscópio óptico.

Figura 8 - Esfregaços para visualização dos espermatozoides corados.



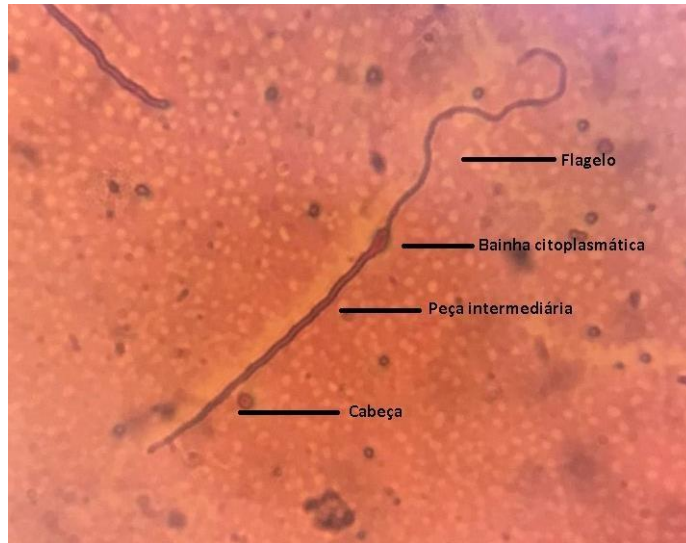
Fonte: Autora (2022)

Os espermatozoides foram avaliados quanto à presença de anomalias na cabeça, peça intermediária ou flagelo, sendo visualizados em um microscópio ótico Optom TIM-2008CCD® (40x ampliação) quantificados em 100 espermatozoides por lâmina (Soares et al., 2010).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espermatozoides dos elasmobrânquios parecem manter um padrão de morfologia com uma cabeça em formato helicoidal, longa e pontiaguda, auxiliando na penetração do óvulo (Dulka; Gadomski; Dabrowski; 2019), fato também observado para a espécie *D. hypostigma*., a qual possui um espermatozoide comprido em forma de espiral com um flagelo longo, característica que garante motilidade à célula para chegar com sucesso ao oviduto da fêmea (ROWLEY et. al, 2019). São divididos em cabeça, a qual ocupa a maior parte do tamanho total do espermatozoide, peça intermediária e um flagelo ligado à peça intermediária através de uma bainha citoplasmática um pouco mais larga do que o restante da célula (Figura 9).

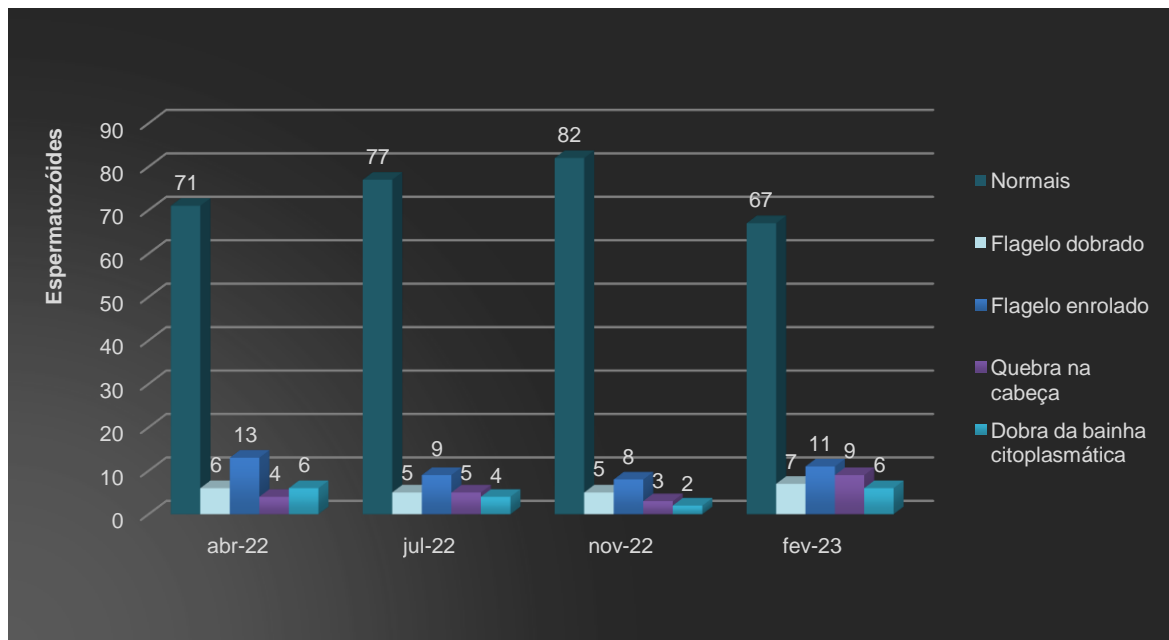
Figura 9 - Visão geral do espermatozóide.



Fonte: Autora (2023)

Para os 100 espermatozoides quantificados em cada colheita, foram observados e analisados quanto às patologias encontradas.

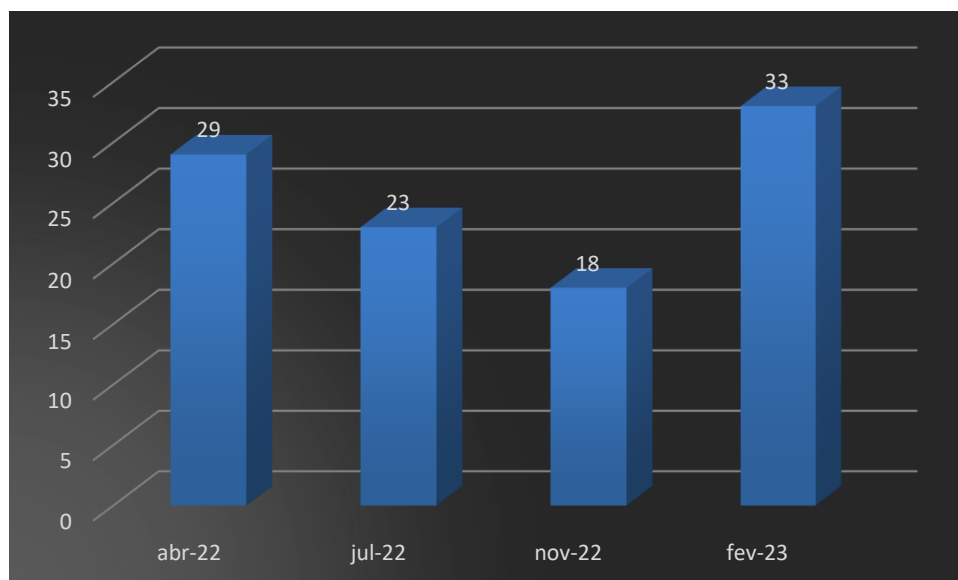
Gráfico 1 - Quantidade de espermatozoides normais e anormais e tipos de patologias para cada coleta realizada.



Fonte: Autora (2023)

Foram identificadas 29 células anormais em Abril de 2022, 23 em Julho de 2022, 18 em Novembro de 2022 e 33 em Fevereiro de 2023 (Gráfico 2).

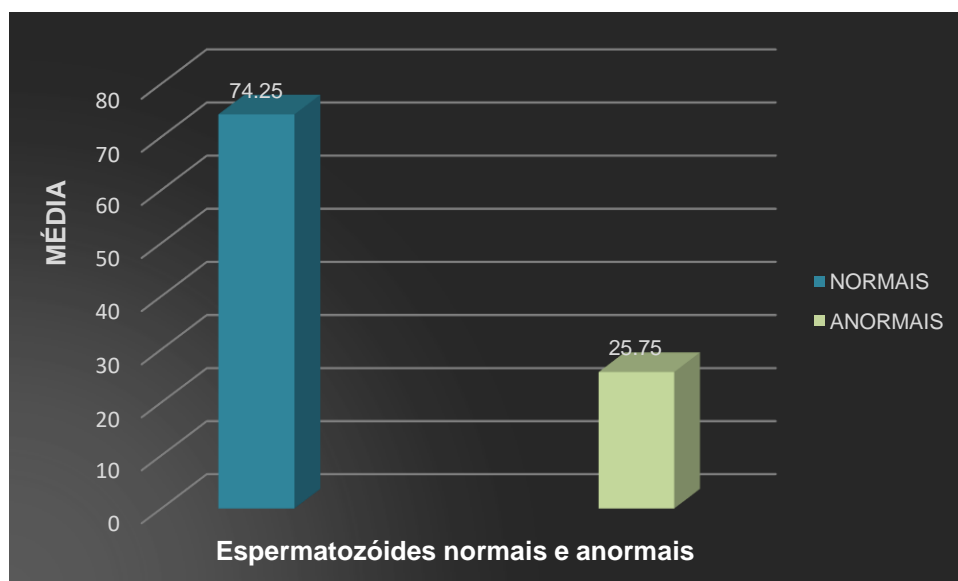
Gráfico 2 - Células anormais por coleta.



Fonte: Autora (2023)

A coleta que mais apresentou células anormais foi a de Fevereiro de 2023 com 33 anormalidades (7 flagelos dobrados, 11 flagelos enrolados, 9 defeitos na cabeça e 6 dobras na bainha citoplasmática), seguida pela coleta de Abril de 2022, com 29 células anormais (6 flagelos dobrados, 13 flagelos enrolados, 4 defeitos na cabeça e 6 dobras na bainha citoplasmática).

Gráfico 3 - Média total de espermatozóides normais e anormais observados.



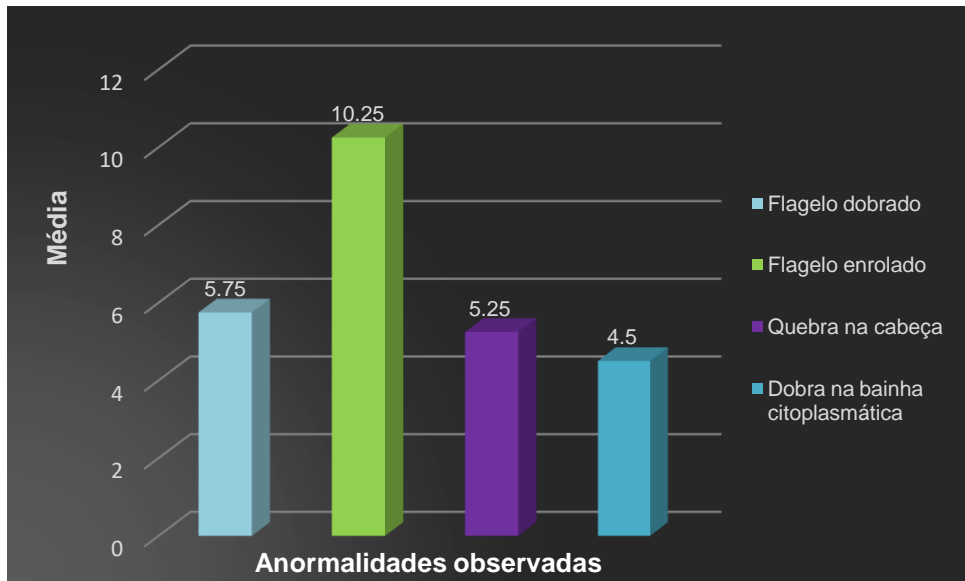
Fonte: Autora (2023)

Estudos realizados recentemente analisaram a relação da morfologia espermática com a fertilidade em raias da espécie *Potamotrygon motoro* (MÜLLER & HENLE, 1841), com resultados sugerindo que a qualidade dos espermatozoides pode afetar a taxa de fertilização e o sucesso reprodutivo (Pardo et al., 2019). Em um estudo realizado por Morales-Gamba (2019) analisando a morfologia espermática de *Potamotrygon wallacei* (CARVALHO, ROSA & ARAUJO, 2016), indicou que o sêmen in natura era de alta qualidade em termos morfológicos, visto que de 100 espermatozóides observados, 92 deles apresentaram células morfolologicamente normais, e os danos encontrados quanto à estrutura do espermatozóides foram todos relacionados à integridade do flagelo (flagelo dobrado, enrolado e quebrado). No entanto, os animais utilizados no estudo de Morales-Gamba (2019), foram sacrificados, enquanto que no presente estudo os animais foram apenas contidos fisicamente, através de técnicas de manejo não invasivo utilizada pela equipe técnica do Oceanic Aquarium.

As células normais totalizaram mais de 70% das células observadas ($74,25 \pm 7,97$), enquanto Padilha (2020) analisou a qualidade espermática de *Potamotrygon falkneri* (CASTEX & MACIEL, 1963), na qual a colheita do esperma também foi realizada sem a necessidade de eutanásia, apenas por contenção física e química, onde foram observados 72,2% de células normais. Assim como o estudo publicado sobre a morfologia espermática de *P. wallacei* de Morales-Gamba (2019) e *P. falkneri* de Padilha (2020), os resultados obtidos mostraram que o sêmen de *D. hypostigma* apresentou boa qualidade, uma vez que a percentagem de células normais totalizou mais de 70% das células analisadas.

Foram observados defeitos na cabeça ($5,25 \pm 2,27$), dobra da bainha citoplasmática ($4,5 \pm 1,65$), flagelo dobrado ($5,75 \pm 0,82$) e flagelo enrolado ($10,25 \pm 1,91$), em todas as quatro amostras em decorrência de patologias primárias e secundárias (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Média, por coleta, de espermatozoides anormais.



Fonte: Autora (2023)

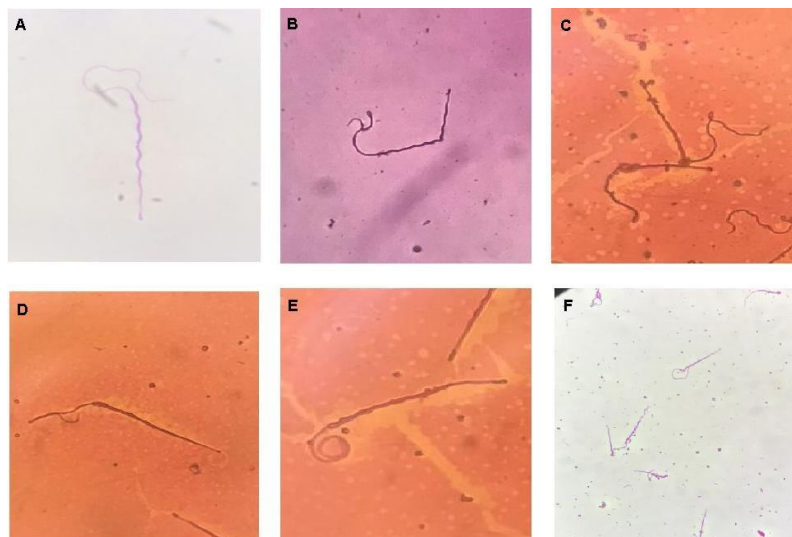
Os espermatozoides com flagelos enrolados foram observados com maior frequência ($10,25 \pm 1,91$) levando-se em conta o total de anormalidades observadas, sendo esta, uma patologia secundária. Apesar de terem sido identificadas células anormais (média total de anormalidades nas 4 amostras - 25,75%) nas amostras de sêmen, os resultados deste estudo, em adição à prenhez de duas fêmeas que habitavam o mesmo recinto, mostraram que houve sucesso reprodutivo, com um padrão de sazonalidade de cerca de seis meses.

A quantidade de espermatozoides normais nas amostras prevaleceu em todas as coletas ($74,25 \pm 7,97$), e, apesar do número de anormalidades, houve sucesso reprodutivo, com o nascimento de uma prole saudável. Sendo assim, os dados observados indicaram uma qualidade e quantidade de espermatozoides viáveis para uma possível reprodução em cativeiro, fato importante para futuras ações de recuperação populacional com programas bem delineados de repovoamento dentro da área de distribuição original da espécie *D. hypostigma*.

As anomalias observadas em cada coleta podem ser em decorrência tanto da manipulação do esperma, que após fixado causa morte imediata das células, bem como durante o processo de espermatogênese, podendo indicar algum estresse ocorrido no ambiente, pois apesar das condições do tanque permanecerem estáveis, os animais podem ter alguma mudança de comportamento ou de interações com os outros animais que dividem o mesmo recinto, alterando suas funções hormonais. De

acordo com Morales-Gamba (2019), as diferenças na morfologia dos espermatozoides são resultado de adaptações ao ambiente de fertilização.

Figura 10 - Espermatozoides normais e anormais (40x); A) morfologicamente normal (40x); B) defeitos na cabeça e flagelo dobrado (40x); C) dobra da bainha citoplasmática (40x); D) flagelo dobrado (40x); E) flagelo enrolado (40x); F) vista geral de espermatozoides (10x).



Fonte: Autora (2022)

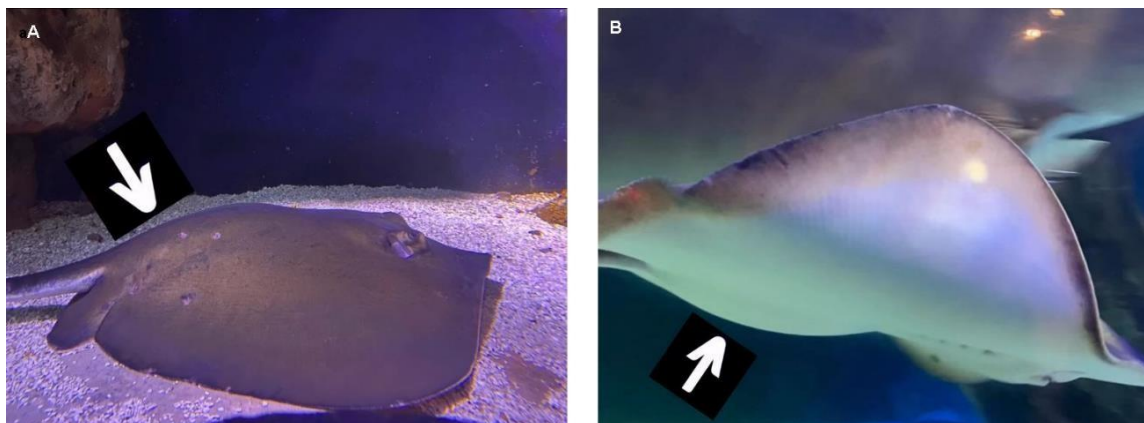
Para além, a última coleta realizada em Fevereiro de 2023, chamou a atenção pela pouca quantidade de esperma (0,3 ml), indicando ter havido uma possível cópula muito próxima ao momento da coleta, e, segundo informações da equipe técnica do Oceanic Aquarium, uma das fêmeas começou a apresentar sinais de uma possível gestação. Os nascimentos na data informada indicaram uma possível cópula no mês de julho, considerando-se uma gestação de cerca de três meses, e outra cópula sugerida para o mês Fevereiro, considerando-se a quantidade reduzida de esperma colheitada neste último mês. Portanto, as informações coletadas apontam para picos reprodutivos nos meses de Julho e Fevereiro.

A Família Dasyatidae é caracterizada por possuir período reprodutivo que varia entre dois e seis meses (WOURMS, 1977), possivelmente duas fecundações por ano. Diferentemente dos indivíduos de vida livre, animais mantidos em cativeiro sob cuidados profissionais, visando a preservação da espécie, não sofrem com condições climáticas como alteração de salinidade, pH e temperatura da água, condições estas, que, ao causarem estresse ao animal, acabam por interferirem na reprodução dos mesmos (YOKOTA, 2005).

Diante das análises, observou-se uma quantidade maior de esperma colheitado nos meses de Julho e Novembro de 2022 com cerca de 2,0 ml de sêmen em cada colheita, evidenciando-se uma reserva de esperma e uma possível cópula próxima ao período em que as colheitas foram realizadas. O volume de esperma colheitado não tem relação direta com a fertilidade, pois é muito variável entre as espécies e pode variar até mesmo dentro da própria espécie, podendo ser influenciado por fatores como clima, estações do ano, período de repouso sexual e método de colheita. (SOLIS-MURGAS et al., 2011).

Tendo como base essas informações colheitadas em campo, foi monitorado o comportamento dos animais nos meses seguintes, e, em Setembro de 2022, foi realizado um ultrassom nas duas fêmeas residentes no aquário, após os mantenedores notarem um aumento de volume no abdômen e curvatura da região dorso-caudal das mesmas (Figura 11).

Figura 11 - A) Aumento de volume na região dorso-caudal; B) Aumento de volume na cavidade celomática.



Fonte: Oceanic Aquarium (2022)

Os partos ocorreram no dia 2 de Outubro de 2022, totalizando-se nove filhotes, sendo quatro de uma fêmea e cinco de outra, sendo estes últimos natimortos, onde não houve uma causa específica conclusiva para esta mortalidade.

Os quatro neonatos (Figura 12) foram levados até o Setor de Quarentena e acondicionados em um tanque berçário, para serem alimentados e monitorados até adquirirem tamanho suficiente para depois serem transportados até o aquário principal. O tamanho e massa corpórea dos neonatos foi de cerca de 128 g e 14 cm.

Figura 12 - Neonatos da raia-manteiga, no setor de quarentena.



Fonte: Autora (2022)

Os estudos realizados com as espécies *P. motoro* por Loboda (2010), *P. wallacei* por Morales-Gamba (2019), e *P. falkneri* por Padilha (2020), citados anteriormente, indicam que os espermatozoides de raias apresentam características morfológicas adaptadas para a fecundação em ambiente aquático, como uma cauda longa e delgada para a locomoção na água, e um acrossoma grande e bem desenvolvido para a penetração no ovócito da fêmea durante a fertilização. Esses resultados incentivam a produção de estudos futuros relacionados à reprodução assistida, pois viabilizariam a criação de estratégias adequadas para a conservação da espécie, fazendo alusão à reprodução assistida.

Tendo em vista os dados coletados, além de toda bibliografia utilizada para a construção deste trabalho, conclui-se que os resultados obtidos corroboram com a hipótese inicial de que os indivíduos mantidos sob cuidados profissionais são candidatos aptos à ideia de reprodução assistida, respeitando o período reprodutivo do animal, já que a espécie em questão apresenta dois picos reprodutivos por ano e boa qualidade espermática.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização espermática de *D. hypostigma* é um assunto extremamente importante para se compreender a biologia reprodutiva desta espécie. Através da análise da morfologia espermática se tem dados sobre a qualidade do sêmen, além de fornecer informações úteis para a conservação da espécie.

Os estudos realizados sobre a espécie *D. hypostigma* são demasiadamente escassos, e as informações coletadas para a construção deste trabalho mostrou que a espécie apresenta características distintas em relação a outras espécies de raias. É importante ressaltar que a caracterização espermática desta espécie ainda é um assunto que apresenta lacunas a serem preenchidas quanto à literatura científica, fomentando a necessidade de se realizarem mais estudos para se aprofundar o conhecimento sobre a biologia reprodutiva destes animais.

Informações a respeito da biologia reprodutiva das espécies tornariam viáveis a implementação de planos de conservação e técnicas de manejo adequados de maneira a se garantir a conservação da espécie.

Dessa forma, os resultados apresentados sugerem que a espécie *D. hypostigma* poderia ser adequada para a implementação de um programa de reprodução assistida efetivo, quando mantida em condições estáveis e sob cuidados profissionais. Além disso, o fato de ser uma espécie ameaçada, classificada com “em perigo” pela lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN, fomenta ainda mais a idéia de que sejam implementadas iniciativas de manejo que possam representar futuras ações de preservação para a espécie em questão.

REFERÊNCIAS

BORNATOWSKI, H; ABILHOA, V. **Tubarões e raias capturados pela pesca artesanal no paraná:** Guia de identificação. Curitiba: Hori Consultoria Ambiental, p.124, 2012.

CAMPOS-JUNIOR, P. H. A., ARAUJO, F. G., DA SILVA, L. H. A., & FERNANDES, C. A. **Spermiogram and seminal plasma characteristics of the Atlantic stingray (*Dasyatis americana*).** Journal of Applied Ichthyology, p. 952-956, 2018.

CASTRO, J. I. **The Sharks of North America.** Oxford University Press, 2004.

COLIN, B. **O sentido elétrico dos Tubarões: Um detector surpreendentemente sensível de campos elétricos ajuda o tubarão a mirar a presa.** Scientific American Brasil, 2007.

COMPAGNO, L. J. V. Checklist of Living Elasmobranchs. In: HAMLETT, W. C. (ed.) **Sharks, skates, and rays: The biology of elasmobranch fishes.** Baltimore: The John Hopkins University Press, p. 471- 498, 1999.

COMPAGNO, L. J. V. **Sharks of the world. An anoted and illustrated catalogue of shark species know to date.** FAO Species Catalogue, Vol. 4, Parts 1 and 2. FAO Fisheries, p. 665, 1984.

COMPAGNO, L.; DANDOO, M.; FOWLER, S. **Sharks of the world. Princeton Field Guides.** New Jersey: Princeton University Press, p. 368, 2005.

DENT, F.; CLARKE, S. **State of the global market for shark products.** FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, p. 590, 2015.

DULVY, N. K., *et al.* **Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays.** eLife, 2014.

DULVY, N.K. *et al.* **You can swim but you can't hide: the global status and conservation of oceanic pelagic sharks and rays.** Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, v. 18, n. 5, p. 459-482, 2008.

FIGUEIREDO, J. L. **Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. I. Introdução. Cações, Raias e Quimeras.** Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, p. 104, 1977.

FISHBASE. 2022. ***Dasyatis hypostigma* Santos & Carvalho 2004.** Disponível em: <https://fishbase.net.br/summary/SpeciesSummary.php?id=63407&lang=portuguese> Acesso em: 10 de Outubro de 2022.

GOMES, U. L.; SIGNORI, C. N; GADIG, O. B. F.; SANTOS, H. R. S. **Guia para identificação de tubarões e raias do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro: Technical Books, p. 234, 2010.

HAMLETT, W. C. **Reproductive biology and phylogeny of chondrichthyes: sharks, rays and chimaeras.** Science Publishers, 2005.

INSTITUTO CHICO MENDES. 2016. **Avaliação do risco de extinção dos elasmobrânquis e quimeras no Brasil: 2010-2012.** Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/trabalhos_tecnicos/pub_2016_avaliacao_elasmo_2010_2012.pdf. Acesso em 23 de Agosto de 2022.

IUCN RED LIST. 2020. **Groovebelly Stingray: *Dasyatis hypostigma*.** Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/60154/3090027>. Acesso em 22 de Agosto de 2022.

LOBODA, T.S. **Revisão taxonômica e morfológica de *Potamotrygon motoro* (Müller & Henle, 1841) na Bacia Amazônica (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae),** Universidade de São Paulo, 2010

NELSON J.S.; GRANDE T.C.; WILSON M.V.H. **Fishes of the world.** quinta ed. Hoboken, ou NJ: John Wiley & Sons, Inc.; 2016.

PADILHA, F.L.A. **Validação de métodos de colheita e a avaliação espermática em raias do gênero *Potamotrygon***. Universidade de São Paulo, 2020

PITNICK S.; HOSKEN D.J, BIRKHEAD T.R **Diversidade morfológica dos espermatozoides**. In Sperm Biology, an Evolutionary Perspective (eds Birkhead TR, Hosken DJ and Pitnick S), pp. 69-149. Londres, Reino Unido: Academic Press. 2009.

SALMITO-VANDERLEY C.S.B. *et al.* **Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae**. *Ciência Animal*, 22 (1): 255-268.

SANTOS, H. R. S.; CARVALHO, M. R. **Description of a new species of whiptailed stingray from the southwestern Atlantic Ocean (*Chondrichthyes, Myliobatiformes, Dasyatidae*)**. *Boletim do Museu Nacional, Nova Série, Zoologia*, 516, 2004.

SANTOS, H. R. S.; GOMES, U. LEITE; CHARVET-ALMEIDA, P. **A new species of whiptail stingray of the genus *Dasyatis* Rafinesque, 1810 from the Southwestern Atlantic Ocean (*Chondrichthyes: Myliobatiformes: Dasyatidae*)**. *Zootaxa*, 492: 1-12, 2004.

SOARES, K. D. A., & CARVALHO, M. R. **Reproduction and feeding of the southern stingray, *Dasyatis americana* (*Chondrichthyes: Dasyatidae*), in the southwest Atlantic**. *Zoologia*, 186-193p. 2015.

SOFIA. 2022., **The state of world fisheries and aquaculture**. Disponível em <https://www.fao.org/3/cc0461en/online/cc0461en.html>. Acesso em 19 de Março de 2023.

VOOREN, C. M.; KLIPPEL, S., **Ações para a conservação de Tubarões e Raias no Sul do Brasil**. Porto Alegre: Igaré. 262p. 2005

D. M. Waller, T. M. Collins, & D.M. Weigmann. **Sperm morphology and evolution of the superorder batoidea**. *Journal of Morphology*. 270p. 2009.

WEIGMANN, S. **Annotated checklist of the living sharks, batoids and chimaeras (Chondrichthyes) of the world, with a focus on biogeographical diversity.** Journ. Fish, Biol. 88: 837-1037. 2016

YOKOTA, L. **Caiçara do Norte (RN): um berçário de tubarões e raias?** Dissertação (Mestrado em biologia animal) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, Recife. 2005