

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 31/01/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
IBB - INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

MARIA LUIZA RIBEIRO DELGADO

MORFOLOGIA REPRODUTIVA MASCULINA E
ESPERMATOGÊNESE DA RAIA DE ÁGUA DOCE
Potamotrygon amandae (MYLIOBATIFORMES,
POTAMOTRYGONIDAE)

Botucatu
2022

MARIA LUIZA RIBEIRO DELGADO

**MORFOLOGIA REPRODUTIVA MASCULINA E
ESPERMATOGÊNESE DA RAIA DE ÁGUA DOCE
Potamotrygon amandae (MYLIOBATIFORMES,
POTAMOTRYGONIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) – Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Rosicleire Veríssimo Silveira

Botucatu
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Delgado, Maria Luiza Ribeiro.

Morfologia reprodutiva masculina e espermatogênese da raia de água doce *Potamotrygon amandae* (MYLIOBATIFORMES, POTAMOTRYGONIDAE) / Maria Luiza Ribeiro Delgado. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Rosicleire Veríssimo Silveira

Capes: 20400004

1. Elasmobrânquios. 2. Rajidae. 3. Epidídimo.
4. Testículos. 5. Vesícula seminal. 5. Espermatogênese em animais.

Palavras-chave: Chondrichthyes; Epidídimo; Glândula de Leydig; Testículo; Vesícula seminal.

Dedico este trabalho primeiro a meus pais, e depois a todos as pessoas que foram fundamentais para que esta caminhada fosse concluída, as que continuaram e até mesmo as que se foram por algum motivo; cada um de vocês deixou algo de si em mim, e fizeram parte de toda essa jornada.

*“A felicidade só é real quando é compartilhada”
(Into the Wild).*

*“Pergunto coisas ao buriti; e o que ele responde é:
a coragem minha. Buriti quer todo o azul, e não se
aparta de sua água - carece de espelho. Mestre não
é quem sempre ensina, mas quem de repente
aprende”*

Guimarães Rosa (Grande Sertão Veredas)

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa (processo 132523/2020-5). Agradeço o apoio a esta pesquisa e a possibilidade de trabalhar com o que amo.

Aos membros **desta banca**, agradeço pelo aceite ao convite e, principalmente, por contribuírem com o meu trabalho.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, por ter me proporcionado primeiramente a minha formação, e depois pesquisar dentro da profissão que perfeitamente elucida quem eu sou.

Aos funcionários da pós graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Ciências de Botucatu, em especial a Davi Müller e Prof. Dr. Antônio Castilho por toda atenção, compreensão e trabalho.

Aos funcionários do BDZ, Departamento de Biologia e Zootecnia da UNESP/FEIS, em especial à Meiri, Júnior, Wilder, Sidival e Luzinete, a atenção, apoio e ajuda colaboração de vocês ajudaram a construir este trabalho.

A minha “mãe científica” minha orientadora, **Rosicleire Veríssimo Silveira**, que me encaminhou e me ensinou tudo o que hoje me torna uma profissional, assim como ensinou o que é certo e a maturidade científica que hoje almejo. Uma honra ser orientada e poder absorver, nem que seja um milésimo, de seu conhecimento durante todos estes anos. Agradeço a todas as palavras de incentivo, aos puxões de orelha (que não foram poucos) e as correções, que me guiaram no caminho do certo, não apenas do fácil. Obrigada por cada momento e pela dedicação.

Ao meu “pai científico”, Alexandre Ninhaus Silveira, que me demonstrou paciência, companheirismo e dedicação tanto no laboratório quanto na minha vida, durante todos esses anos de convivência e cuja gratidão não pode ser expressa em palavras.

Aos meus pais, Paulo Sérgio Delgado e Alessandra Oliveira Ribeiro Delgado, pela compreensão na escolha do caminho que eu queria seguir, por lutarem por mim em cada batalha que eu não pude lutar sozinha. Por mesmo de longe iluminarem o meu caminho, me guiarem

na trajetória do bem. Por serem os exemplos encarnados de pessoas que eu gostaria de ser. Eu amo vocês.

Ao meu irmão, Paulo Otávio Ribeiro Delgado, obrigada por cada resenha e noite de filmes, cada “Face Off” assistido, as músicas do pessoal cantando em línguas estranhas e as receitas que fazemos juntos. Amo você.

A minha noiva, Carla Araújo de Souza, pela compreensão, apoio e companheirismo durante os períodos mais críticos, pelos momentos bons e os não tão bons assim, que independentemente foram passados com amor. Agradeço a cada minuto por poder caminhar nessa vida ao seu lado. *“I would walk five hundred miles for you”*.

Ao grupo “Bonde das Maravilhas”, que tem como membros Crystal, Patrícia e Laís, amigas que ganhei graças ao laboratório e que pretendo manter muitos anos mais, vocês são incríveis meninas.

A Mayanna e Kawanna, que ajudaram a formar os quatro pilares que sustentam o meu lar. A vocês, agradeço por todo companheirismo e bons momentos, que marcaram para sempre a experiência única dessa vida.

Aos meus companheiros de laboratório, Laboratório de Ictiologia Neotropical, por cada ajuda, cada aprendizado, cada ação em conjunto, este trabalho tem um pedacinho de vocês.

Agradeço, enfim, a todas as pessoas que passaram pela minha vida e de alguma forma contribuíram com meu crescimento acadêmico, intelectual e pessoal.

RESUMO

Com o enchimento do reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu, rio Paraná, Brasil, a partir da década de 1970, o obstáculo natural que isolava parte da ictiofauna do Alto Rio Paraná da fauna dos sistemas à jusante deixou de existir, possibilitando a colonização por espécies invasoras, como a raia *Potamotrygon amandae*. Chondrichthyes (tubarões, raias e quimeras) apresentam o trato reprodutivo complexo, mais semelhante aos anfíbios e amniotas do que peixes teleósteos, formado por testículos, epidídimo, glândula de Leydig e vesícula seminal. Assim, é de grande importância analisar o funcionamento destes órgãos e seus respectivos papéis na reprodução. O trabalho objetivou descrever a morfologia macro e microscópica do trato reprodutivo masculino de *Potamotrygon amandae*, assim como a descrição da espermatogênese da espécie. Indivíduos machos de *Potamotrygon amandae* (n=10) foram coletados no reservatório de Jupuíá, rio Paraná, Ilha Solteira-SP, anestesiados com solução de MS 222; os órgãos reprodutivos foram removidos, fragmentados e fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sorensen, 0,1M a pH 7,2, e processados para análise em microscopia de luz. Em *P. amandae* os testículos são separados do restante dos órgãos do trato por uma camada fina de mesentério, exibem lóbulos testiculares e zonas germinativas bem demarcados. Os demais órgãos estão localizados próximos aos rins, na parte dorsal da cavidade celomática. O epidídimo, órgão alongado e avermelhado, tem a parte cranial avantajada, liga-se a glândula de Leydig pela extremidade caudal. As glândulas têm a porção cranial estreita, corpo avantajado, coloração avermelhada; sua porção caudal liga-se a vesícula seminal, órgão longo e curvilíneo, coloração hialina que se estende até a abertura da cloaca. O epidídimo é constituído por uma rede anastomosada de ramificações oriundas do ducto deferente formada por ductos e túbulos, ambos têm a função de transporte de espermatozoides e apresentam epitélio pseudoestratificado e estratificado colunar, respectivamente. A glândula é composta pelo ducto deferente e pelo tecido glandular que envolve o ducto. O tecido glandular é composto por unidades glandulares do tipo tubular ramificado, com epitélio simples colunar, células de núcleos basais e citoplasma apical, maioria secretora e é possível observar secreção no lúmen. A vesícula seminal é composta pelo ducto deferente que apresenta estrutura em espiral que se projeta em formação de curvas por todo o órgão; o ducto possui um epitélio simples colunar com células ciliadas apoiadas sobre a lâmina basal. O epitélio germinativo do testículo é dividido em zonas germinativas; a espermatogênese é cística, onde se dá o desenvolvimento das células germinativas em desenvolvimento (espermatogônias, espermátocitos, espermátides e espermatozoides). Cada cisto é formado e mantido pelas células de Sertoli, que sofrem modificações morfológicas e de localização no decorrer da espermatogênese. Quando na periferia, os cistos formam uma camada em degeneração após a liberação dos espermatozoides para o ducto, que é único e em formato de serpentina. Os órgãos reprodutivos apresentam intrínseca relação entre a sua morfologia e a função de formação, transporte, manutenção e armazenamento dos espermatozoides e líquido espermático, que garantem o sucesso reprodutivo da espécie. A histologia da espermatogênese de *Potamotrygon amandae* não havia sido descrita anteriormente.

Palavras-chave: Chondrichthyes, Ductos Extra Testiculares, Epidídimo, Glândula de Leydig, Vesícula Seminal, Testículo, Epitélio germinativo.

ABSTRACT

With the filling of the reservoir of the Itaipu Hydroelectric Power Plant, Paraná River, Brazil, from the 1970s onwards, the natural obstacle that isolated part of the Upper Paraná River's ichthyofauna from the fauna of the downstream systems ceased to exist, allowing colonization by species invasive ray *Potamotrygon amandae*. Chondrichthyes (sharks, rays and chimeras) have a complex reproductive tract, more similar to amphibians and amniotes than teleost fish, formed by testes, epididymis, Leydig's gland and seminal vesicle. Thus, it is of great importance to analyze the functioning of these organs and their respective roles in reproduction. The work aimed to describe the macro and microscopic morphology of the male reproductive tract of *Potamotrygon amandae*, as well as the description of the spermatogenesis of the species. Male individuals of *Potamotrygon amandae* (n = 10) were collected in the Jupuíá reservoir, Paraná River, Ilha Solteira-SP, anesthetized with MS 222 solution; the reproductive organs were removed, fragmented and fixed in a 4% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde solution in Sorensen phosphate buffer, 0.1M at pH 7.2, and processed for analysis under light microscopy. In *P. amandae*, the testes are separated from the rest of the tract organs by a thin layer of mesentery, exhibiting well-defined testicular lobes and germinal zones. The other organs are located near the kidneys, in the dorsal part of the coelomic cavity. The epididymis, an elongated and reddish organ, has a large cranial part, connecting to the Leydig gland at the caudal end. The glands have a narrow cranial portion, large body, reddish color; its caudal portion connects to the seminal vesicle, a long and curvilinear organ, with a hyaline color that extends to the opening of the cloaca. The epididymis is constituted by an anastomosed network of branches originating from the vas deferens formed by ducts and tubules, both of which have the function of transporting sperm and present pseudostratified and columnar stratified epithelium, respectively. The gland is made up of the vas deferens and the glandular tissue that surrounds the duct. The glandular tissue is composed of glandular units of the branched tubular type, with simple columnar epithelium, cells with basal nuclei and apical cytoplasm, mostly secretory, and it is possible to observe secretion in the lumen. A seminal vesicle composed of the vas deferens that has a spiral structure that projects in curves throughout the organ; the duct has a simple columnar epithelium with hair cells resting on the basal lamina. The germinal epithelium of the testis is divided into germinal zones; spermatogenesis is cystic, where the development of developing germ cells (spermatogonia, spermatocytes, spermatids and spermatozoa) takes place. Each cyst is formed and assembled by Sertoli cells, which determine morphology and location during spermatogenesis. When in the periphery, the cysts form a degenerating layer after the release of sperm into the duct, which is unique and serpentine-shaped. The reproductive organs have an intrinsic relationship between their morphology and the function of formation, transport, maintenance and storage of sperm and spermatic fluid, which ensure the reproductive success of the species. The histology of spermatogenesis of *Potamotrygon amandae* has not been previously described.

Keywords: Chondrichthyes, Extra Testicular Ducts, Epididymis, Leydig's Gland, Seminal Vesicle, Testis, Germ epithelium.

Lista de Figuras

- Figura 1** - Medidas corporais em indivíduo macho adulto de *P. amandae*, onde LD – Largura de disco, CD – comprimento de disco, e CT – comprimento total. Barra de escala: 10cm. 14
- Figura 2** - Diagrama do ciclo reprodutivo proposto para machos e fêmeas de *H. marianae*. 16
- Figura 3** - Ilustração do lado direito do trato reprodutivo masculino de *Potamotrygon* sp. representando o testículo (T), epidídimo (E), glândula de Leydig (GL) e vesícula seminal (VS).
..... 17
- Figura 4** - Representação de três tipos de estruturas testiculares. Setas indicam o sentido percorrido pela produção de espermatozoides no testículo. 19
- Figura 5** - Espécime de *Potamotrygon amandae*. A - Visão dorsal de indivíduo macho adulto. B– Visão ventral de indivíduo macho adulto. Cláspers (setas), cloaca (cabeça de seta). Barras de escala: A: 10cm, B: 1cm. 37
- Figura 6** - Características macroscópicas do trato reprodutivo masculino de *Potamotrygon amandae*. A - Visão ventral de indivíduo macho adulto, órgãos internos na cavidade celomática. Testículos (T) separados do restante dos órgãos pela camada de mesentério (M), s 38
- Figura 7** - Morfologia interna do testículo de indivíduo adulto de *P. amandae*. A: Ilustração esquemática da visão longitudinal do testículo, setas indicam sentido do desenvolvimento das células germinativas em desenvolvimento inicial (cabeça de seta) a partir do centro da zona germinativa (ZG). B: Corte longitudinal representando a zona degenerada (ZD), ducto (D), órgão epigonal (OE) e vasos sanguíneos (vs). C: Zona germinativa com parte central formada por cistos de células germinativas, e envolto pela zona degenerada. D: Cisto degenerado (cd) localizado entre a zona germinativa e a degenerada. Escalas: B = 200µm; C= 100µm; D = 20µm. Coloração: B e D: Metanil Yellow associado a P.A.S e Hematoxilina Férrica; C: Hematoxilina de Harris associada a Eosina..... 39
- Figura 8** - Morfologia interna do testículo de indivíduo adulto de *P. amandae*. A e B: corte longitudinal indicando a posição do ducto (D) rodeado por tecido conjuntivo (TC) e órgão epigonal (OE). B e B input: Epitélio simples do ducto indicando núcleo das células (nu). C: revestimento do órgão pelo epitélio de revestimento (EP), em seguida tecido conjuntivo e órgão epigonal. D – Estrutura do tecido conjuntivo denso do revestimento do órgão, constituído por fibroblastos (fb) e fibras colágenas (fc). E = histologia do órgão epigonal, indicando plasmócitos (p), linfócitos (l) e neutrófilos (n). Escalas: A = 200µm; B e C= 50µm; B input e D= 10µm; E = 20 µm. Colorações: Hematoxilina de Harris associada a Eosina. 40
- Figura 9** - Extensão e localização do órgão epigonal em machos de *P. amandae*. A: indivíduo jovem, onde o órgão epigonal (OE) se estende pela maior parte do testículo. B: Indivíduo ativo reprodutivamente, onde o órgão epigonal está diminuto e localizado entre as outras estruturas

já formadas. Ducto (D). Tecido conjuntivo (TC). Vasos sanguíneos (vs). Zona germinativa (ZG). Zona degenerada (ZD). Escalas: 200µm. Colorações: A = Azul de toluidina (pH: 7); B = Hematoxilina de Harris associada a Eosina..... 41

Figura 10 - Morfologia interna do epidídimo de indivíduo adulto de *P. amandae*. A: Ilustração esquemática da visão longitudinal do epidídimo indicando a anastomose do ducto (setas) com início na parte inicial do órgão (cabeça de seta). B: Corte longitudinal, pode ser observada a presença de túbulos na região de início da anastomose do ducto. C: Corte longitudinal da região central do órgão. C: Corte transversal da região central do órgão. Escalas: 200 µm. Coloração: Hematoxilina de Harris associada a Eosina e Azul de toluidina (pH: 7). 42

Figura 11 - Cortes transversais do epidídimo de *P. amandae*. A: Ducto constituído por epitélio pseudoestratificado (Eps), indicando o lúmen (Lu) e as vesículas de secreção no citoplasma das células (setas). B, C e D: Estrutura do epitélio pseudoestratificado do ducto, com células apoiadas sobre a lâmina basal (lb) e células secretoras com vesículas de secreção no citoplasma. E e E input: Epitélio estratificado (EE) dos túbulos indicando as células basais (cb) com presença de cílios (c) e células apicais (ca), também com a presença de vesículas de secreção no citoplasma das células. Núcleo (n). Escalas: A = 20µm; B e E =10 µm; C, D e E input= 5µm. Colorações: A, B, C, D, E e E input = Metanil Yellow associado a P.A.S e Hematoxilina Férrica, D - Método de Reticulina. 43

Figura 12 - Cortes transversais do epidídimo de *P. amandae*. A, B e C: Presença de células secretoras (seta) no epitélio dos ductos nas regiões inicial, média e final do órgão, respectivamente. D e E: Tecido conjuntivo do órgão entorno dos túbulos e ductos, respectivamente, com a presença de fibroblastos (fb) e fibras colágenas (fc). Vasos sanguíneos (vs). Escalas: A, B, C e D = 20µm. E = 10 µm. Coloração: Metanil Yellow associado a P.A.S. 44

Figura 13 - Morfologia interna da Glândula de Leydig de *P. amandae*. A e B – Cortes longitudinal e transversal, respectivamente, demonstrando a passagem da porção final do epidídimo para a glândula de Leydig, onde o ducto (cabeça de seta) começa a ser envolvido pela glândula (setas). C e D: Cortes longitudinal e transversal, respectivamente, da região inicial da glândula de Leydig, demonstrando o ducto parcialmente envolvido pela glândula. Escalas: 200µm. Colorações: A e C: Hematoxilina de Harris associada a Eosina; B e D: Metanil Yellow associado a P.A.S e Hematoxilina Férrica..... 45

Figura 14 - Glândula de Leydig de *P. amandae*. A: Ilustração esquemática da visão longitudinal da glândula de Leydig indicando o ducto (cabeça de seta) sendo quase totalmente envolvido pela glândula (setas). B e C: Cortes longitudinal e transversal, respectivamente, da porção central da glândula. Escalas: 200µm. Colorações: B = Hematoxilina de Harris associada a Eosina; C = Metanil Yellow associado a P.A.S e Hematoxilina Férrica. 46

Figura 15 - Cortes transversais da porção central da Glândula de Leydig de *P. amandae*. A: Ducto (D) centralizado, envolto quase totalmente pelas unidades glandulares (UG). B: Epitélio pseudoestratificado (Eps) da região inicial do órgão, presença de células apicais (ca) e células

basais (cb) apoiadas sobre a lâmina basal (lb). C e D: Epitélio simples (es) do ducto na parte final do órgão. E, F e G: Unidades glandulares constituídas por epitélio simples, secreção presente no lúmen (s) e células mioepiteliais (m). c: cílios; n: núcleo. Escalas: A = 100µm; C, E e G = 10µm; B, D e F = 5µm. Colorações: A, B, C e E: Metanil Yellow associado a P.A.S, Hematoxilina Férrica; F: Azul de toluidina (pH: 7); G: Método de Reticulina.47

Figura 16 - Morfologia Interna da vesícula seminal de indivíduo adulto de *P. amandae*. A, B e C: Respectivamente início, meio e final do órgão, demonstrando as dobras (setas) do ducto (D). Escalas: A, B e C = 200µm. Colorações: Metanil Yellow associado a P.A.S.48

Figura 17 - Cortes longitudinais da Vesícula Seminal de *P. amandae*. A - Ilustração esquemática e corte histológico, respectivamente, indicando a posição do ducto (cabeça de seta) centralizado no órgão, envolto pelo tecido conjuntivo (TC). Escalas: B = 200µm. Colorações: Hematoxilina de Harris associada a Eosina.49

Figura 18 - Morfologia Interna da vesícula seminal de indivíduo adulto de *P. amandae*. A e B: Epitélio simples (Es) do ducto, com presença de células ciliadas (c) e secretoras (s) apoiadas sobre a lâmina basal (lb). C e D: Túnicas média (tm) e albugínea (ta), onde estão presentes fibroblastos (fb) e fibras colágenas (fc). Núcleo (n). Escalas: A e B = 10µm; C = 50µm; I = 20 µm. Colorações: A = Azul de toluidina (pH: 7); B, C e D = Metanil Yellow associado a P.A.S, Hematoxilina Férrica.50

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Estágios de maturação do trato reprodutivo de raias de água doce.....	23
---	----

SUMÁRIO

Capítulo 1 - Revisão de Literatura	11
1. VISÃO GERAL.....	12
1.2 Aspectos reprodutivos de elasmobrânquios.....	14
1.3 Ciclo reprodutivo.....	15
1.4 Morfologia do Trato Reprodutivo Masculino.....	16
1.5 Espermatogênese em Elasmobrânquios.....	20
1.6 Fases de Maturação Sexual.....	22
REFERÊNCIAS.....	24
OBJETIVOS	30
Objetivo geral.....	30
Objetivos específicos.....	30
Capítulo 2 - Estrutura Macro e Microscópica do Trato Reprodutivo Masculino da Raia de Água Doce <i>Potamotrygon amandae</i> (Myliobatiformes, Potamotrygonidae)	31
1. INTRODUÇÃO.....	32
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3. RESULTADOS.....	33
3.1 Estrutura Macroscópica do Trato Reprodutivo Masculino.....	33
3.2.1 Testículo.....	34
3.2.2 Epidídimo.....	35
3.2.2 Glândula de Leydig.....	36
3.2.3 Vesícula Seminal.....	36
4. DISCUSSÃO.....	51
5. CONCLUSÕES.....	Erro! Indicador não definido.
REFERÊNCIAS.....	52
DIFICULDADES ENCONTRADAS E PRÓXIMAS ETAPAS	Erro! Indicador não definido.
REFERÊNCIAS.....	Erro! Indicador não definido.
CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	Erro! Indicador não definido.

Capítulo 1 - Revisão de Literatura

1. VISÃO GERAL

A infraclasse Elasmobranchii (ou Neoselachii) é o grupo que inclui todas as raias e tubarões existentes dentro de dois clados conhecidos, a divisão Selachii, que abrange os tubarões, e a divisão Batomorphi (as raias e os *skates*), frequentemente chamada de Batoidea. A divisão Batomorphi é dividida, em quatro ordens: Torpediniformes, Rajiformes, Pristiformes e Myliobatiformes. A ordem Myliobatiformes apresenta 12 famílias e é a única que possui representantes dulcícolas (COMPAGNO; COOK, 1995; NELSON *et al.*, 2016).

Estudos sugerem que a transição do ambiente marinho para o ambiente dulcícola pode ter ocorrido de modos semelhantes em peixes ósseos e cartilagosos, e que as raias, desde o Cretáceo Superior, colonizaram este ambiente ao menos quatro vezes em acontecimentos independentes, como exemplo temos a colonização do sudeste asiático (gêneros *Dasyatis* e *Himantura*) e sistemas de água doce da América do Sul (*Potamotrygonidae*), de modo que ancestrais marinhos das arraias *Potamotrygonidae* provavelmente ocorreram no Pacífico oriental tropical (KIRCHHOFF *et al.*, 2017).

Dentre os gêneros e espécies da família Potamotrygoninae está presente *Potamotrygon motoro*, uma das espécies mais abrangentes e com registros de ocorrência em sistemas de água doce na América do Sul, como a Amazônia, Bacias do Orinoco, Paraná-Paraguai e Uruguai (ROSA, 1985), e faz parte do único grupo de elasmobrânquios completamente adaptados para a vida exclusivamente dulcícola (COMPAGNO; COOK, 1995).

Dentre as populações de espécies do gênero encontradas na América do Sul estão *Potamotrygon motoro* e *P. brachyura*, registradas, dentre outros países, no Uruguai, onde até a década de 2010, assim como em outros países da América do Sul, ainda não existia uma regulamentação específica para exportação com finalidade de ornamentação aquática, com exceção do Brasil, que já apresentava regulamentação para tal prática (ROSA *et al.*, 2010; ODDONE; VELASCO; CHARVET, 2012).

Na Bacia Amazônica apesar da sua ampla distribuição, estudos indicam uma grande diminuição populacional da espécie *Paratrygon aiereba* (*Potamotrygonidae*); a baixa resiliência e grande suscetibilidade aos impactos antrópicos (pesca comercial, turismo e mineração) tornam a espécie altamente susceptível a extinção, de modo que a mesma já está categorizada como Criticamente em Perigo (CR) (ICMBio, 2018). Porém, para espécies do gênero *Potamotrygon*, os dados são insuficientes para a classificação sobre o estado de conservação global de espécies, incluindo *Potamotrygon motoro* (IUCN 2021).

Na Bacia amazônica as raias são capturadas como parte do recurso alimentar de populações em regiões de baixa drenagem; as populações de raias passaram a fazer parte, também, a partir das últimas décadas como espécies de exportação como ornamentação aquática, tendo as espécies *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi*, *P. schroederi*, *P. leopoldi*, *P. henlei* e outras espécies de *Potamotrygon* (CHARVET-ALMEIDA *et al.*, 2002).

Com o enchimento do reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu no ano de 1982, o obstáculo natural, que isolava grande parte da ictiofauna do Alto Rio Paraná da fauna dos sistemas à jusante, deixou de existir, e abriu a possibilidade de colonização por novas espécies nestes ambientes, como as raias do gênero *Potamotrygon*, que se dispersaram rapidamente para esse novo ambiente (GARRONE-NETO *et al.*, 2007).

A ocorrência de três espécies de raias do gênero *Potamotrygon* foi registrada na região do Alto Rio Paraná: *P. falkneri*, *P. motoro* e *P. schuhmacheri*. Essas espécies se estabeleceram na região do Alto Rio Paraná e ampliaram sua distribuição geográfica a cada ano, favorecida pelas eclusas existentes nas usinas hidrelétricas instaladas ao longo do Tietê-Paraná (GARRONE-NETO; HADDAD Jr.; GADIG, 2014); nestes locais as raias não faziam parte das espécies aquáticas nativas, dado que sua população se estabeleceu em um período relativamente recente (GARRONE-NETO *et al.*, 2007; GARRONE-NETO; HADDAD JR., 2010).

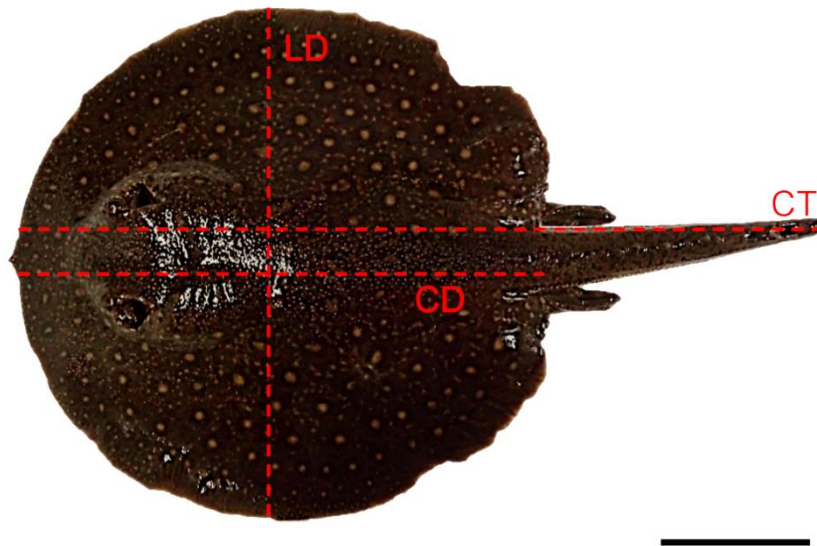
A espécie *Potamotrygon amandae* possui características comparadas as de *P. motoro* (LOBODA; CARVALHO, 2013) de modo que já foi utilizada em lugar de *P. motoro* em trabalhos anteriores (OTA *et al.*, 2018), inclusive em estudos realizados na mesma área deste trabalho, onde *P. amandae* é utilizado como sinonímia de *P. motoro* (PAGLIARINI *et al.*, 2020), já com confirmação de caracteres moleculares que indicam a presença de *Potamotrygon amandae* no Rio Paraná (CRUZ *et al.*, 2021).

P. amandae apresenta uma grande distribuição nas bacias Amazônica e Paraná-Paraguai além de países como Argentina, Bolívia e Paraguai (LOBODA *et al.*, 2016). Neste estudo, realizado no Rio Paraná, iremos nos referir a espécie utilizando *P. amandae*, ainda que trabalhos anteriores com essa espécie dentro do grupo de pesquisa tenham utilizado o nome *P. motoro* (DZYUBA *et al.*, 2018; DZYUBA *et al.*, 2019; DZYUBA *et al.*, 2020).

1.2 Aspectos reprodutivos de elasmobrânquios

Entre os sexos, o tamanho do disco, região que compreende desde o início do corpo do animal na porção cranial até o início da cauda (Fig. 1), pode variar nos indivíduos adultos, sendo menores nos machos. O tamanho de maturação sexual pode, também, variar para algumas espécies do gênero *Potamotrygon*, em *P. motoro* foi estimado 271mm de tamanho de disco para machos e, para fêmeas o tamanho mínimo estimado de maturação sexual foi de 350mm (THORSON, 1983; CHARVET-ALMEIDA *et al.*, 2005; GARRONE-NETO, 2010).

Figura 1 - Medidas corporais em indivíduo macho adulto de *P. amandae*, onde LD – Largura de disco, CD – comprimento de disco, e CT – comprimento total. Barra de escala: 10cm.



Fonte: Própria Autora.

A diferença de morfometria de machos e fêmeas em *P. motoro*, está também associada ao fato de a maioria das modificações entre os sexos estar possivelmente relacionada ao modo de vida da população local; tais diferenças podem ser observadas como adaptações relacionadas ao modo reprodutivo da espécie; dimorfismos como maior comprimento da cloaca e largura das nadadeiras pélvicas de fêmeas em relação aos machos, assim como o comprimento de disco (RINCON *et al.*, 2019).

Um dos maiores dimorfismos dentro de espécies de raias é a presença do cláspers nos machos, órgão copulador que permite a fertilização interna, características de todos os elasmobrânquios, que permite que a energia alocada para reprodução não seja desperdiçada, mas sim que esse alto valor energético se passado agora aos embriões. O cláspers é, então,

considerado um órgão sexual secundário intromitente, ou seja, que é introduzido em outro órgão, no caso o sistema reprodutivo feminino (CARRIER; PRATT; CASTRO, 2004).

Com a fertilização interna, espécies apresentam diferentes períodos de acordo com o tipo de desenvolvimento embrionário, podem exibir i) viviparidade, ovos se desenvolvem retidos na fêmea e nascem já no estado juvenil, e ii) oviparidade, onde os ovos fertilizados são depositados no sedimento ou presas a um objeto (NELSON *et al.*, 2016).

1.3 Ciclo reprodutivo

Para elasmobrânquios, o período reprodutivo e seus eventos específicos estão intrinsecamente relacionados ao ciclo reprodutivo geral e ao tipo de reprodução de cada espécie. Para machos, o ciclo reprodutivo é anual na maioria das espécies e está relacionado ao ciclo feminino, de modo a garantir reservas adequadas de espermatozoides para o acasalamento até o início da ovulação (YOSHIDA; ASTURIANO, 2020).

Relacionado ao período reprodutivo e variando de acordo com o mesmo, temos o IGS, índice gonadossomático, que utiliza uma relação entre a massa gonadal com a massa corpórea do animal, auxiliando a indicação do seu estágio reprodutivo (VAZZOLER *et al.*, 1981; 1996). Para a espécie marinha *Atlantoraja cyclophora* (*eyespot skate*, Rajiformes) foi determinado que o pico reprodutivo seria nos meses de dezembro e novembro, considerando que os maiores índices gonadossomáticos registrados foram para estes meses, onde houve uma diferença significativa em relação aos outros meses (WEHITT *et al.*, 2018).

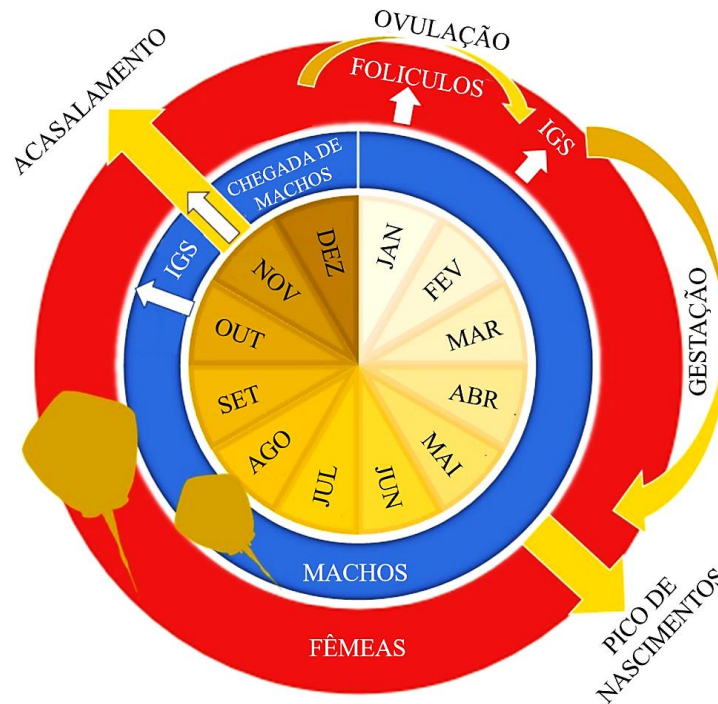
Outras espécies de raias marinhas também apresentam a reprodução para os últimos meses do ano, *Dasyatis sabina* (Myliobatiformes, Dasyatidae) ou Raia do Atlântico, possui espermatogênese tardia entre os meses de outubro a novembro, dados muito próximos dos observados para outra espécie tropical marinha *Hypanus marianae* (Fig. 2); porém, enquanto para *D. sabina* o período copulatório foi observado no início do ano, entre os meses de janeiro e março, para *H. marianae* a cópula ocorre logo após o período de aumento o IGS, entre novembro e dezembro (PIERCY; GELSLEICHTER; SNELSON, 2003; PALMEIRA-NUNES *et al.*, 2019).

A espécie dulcícola *P. motoro* (Potamotrygonidae) tem seu ciclo reprodutivo bem definido e está relacionado ao ciclo hidrológico dos corpos d'água que habita, sendo que este ciclo pode influenciar diretamente a reprodução deste potamotrygonideo, para machos pode durar entre dois e quatro meses, e aproximadamente quatro meses para fêmeas, ambos

compreendidos nas estações de cheia (CHARVET-ALMEIDA, 2005), que compreendem os meses de dezembro, janeiro e fevereiro. na região norte do Brasil.

Outros representantes do gênero também apresentaram o ciclo reprodutivo bem demarcado e intrinsecamente relacionado a sazonalidade do corpo d'água, ainda que em regiões muito distintas do Brasil, a exemplo de *Potamotrygon wallace*, presente no médio Rio Negro, norte do país. Esta correlação também é verificada nos valores de IGS, pois os machos de *P. wallace* em períodos de estiagem, foram observados em regressão e valores de IGS baixos, enquanto que, durante a inundação do rio, período de cheia, foram observados incremento de mais de quatro vezes nos valores de IGS e machos atilvos (MARCON *et al.*, 2021).

Figura 2 - Diagrama do ciclo reprodutivo proposto para machos e fêmeas de *H. marianae*.



Fonte: PALMEIRA-NUNES *et al.*, 2019.

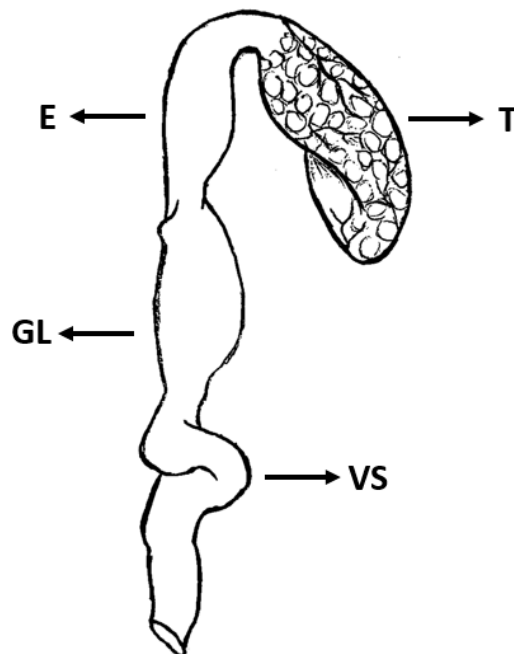
1.4 Morfologia do Trato Reprodutivo Masculino

Em elasmobrânquios, além dos testículos, no trato reprodutivo masculino também estão presentes o órgão epigonal, um par de epidídimos divididos em cabeça, corpo e cauda, glândulas de Leydig, um par de vasos deferentes que se diferenciam distalmente formando as vesículas seminais, além do par de cláspers (RINCON, 2006; SADO *et al.*, 2020). As estruturas descritas são encontradas em raias de doce, a exemplo da raia cururu *Potamotrygon wallacei*, nos quais os machos apresentam testículos ovais associados ao órgão epigonal, separados do

restante dos órgãos por mesentério. Os testículos se apresentam conectados aos ductos que acessam o epidídimo, seguidos por glândulas de Leydig e vesícula seminal do sistema reprodutor (Fig. 2) (MARCON *et al.*, 2021).

Os testículos como órgãos pares e possuem duas funções distintas, espermática e hormonal, ambas se apresentam funcionalmente interdependentes. Neste órgão estão presentes dois tipos celulares principais, células germinativas e células somáticas, que diferem em origem embrionária e em suas funções, atuando respectivamente na espermatogênese e hormonogênese (ENGEL e CALLARD, 2005).

Figura 3 - Ilustração do lado direito do trato reprodutivo masculino de *Potamotrygon* sp. representando o testículo (T), epidídimo (E), glândula de Leydig (GL) e vesícula seminal (VS).



Fonte: Própria autora.

O órgão epigonal, que envolve intrinsecamente os testículos, é uma estrutura mais aparente e desenvolvida em indivíduos imaturos ou jovens, assim como em embriões (BRUNO, 2016; MOYA, 2017), esta estrutura tem forma e tamanho variáveis de acordo com a espécie (CARRIER; PRATT; CASTRO, 2004). Os espermatozoides maduros, produtos finais da espermatogênese, deixam os testículos via ductos eferentes (WOURMS, 1977; ENGEL e CALLARD, 2005).

Para algumas espécies de Myliobatiformes não são observadas diferenças entre os lados dos testículos, considerados órgãos do tipo composto, ambos são desenvolvidos e aparentemente funcionais (THORSON, 1983). Em *Potamotrygon iwamae*, entre os testículos

direito e esquerdo houve uma correlação positiva entre largura e comprimento testicular, além de a correlação entre largura e massa dos testículos ter sido bastante alta. Em machos adultos e considerados em atividade reprodutiva foram observados testículos largos e mais pesados. As medidas de ambos os testículos confirmam um desenvolvimento similar entre os dois órgãos, o que demonstra a funcionalidade de ambos para a espécie (CHARVET-ALMEIDA, 2005). Porém, algumas espécies dentro do grupo podem apresentar diferenças morfométricas entre os testículos, a exemplo da assimetria testicular observada na raia borboleta *Gymnura marmorata* (Myliobatiformes, Gymnuridae), onde apenas o testículo esquerdo era funcional (BURGOS-VÁZQUEZ *et al.*, 2019).

Na estrutura testicular, a formação dos folículos dentro da zona germinativa se apresenta de forma contínua e os folículos recém-formados se afastam continuamente dos locais de sua formação à medida que se desenvolvem e amadurecem, sucessivamente são seguidos pelos recém formados que, realizam o mesmo processo. Este caminho percorrido pelas células germinativas é conservativo e bem fixado entre os grupos de elasmobrânquios, porém, para alguns autores, são considerados três estruturas distintas de testículos, por onde as células percorrem o caminho: radial, diametral e composto, que se apresentam relacionadas a diferentes grupos (STANLEY, 1966; PRATT JR, 1988).

O testículo de Chondrichthyes pode ser diferenciado em três tipos, de acordo com a organização das estruturas envolvidas na produção das células germinativas, essa descrição foi descrita inicialmente por Pratt Jr, (1988) e permanece até o momento como a classificação utilizada na descrição dos testículos de diversas espécies de Chondrichthyes (YOSHIDA, ASTURIANO, 2020).

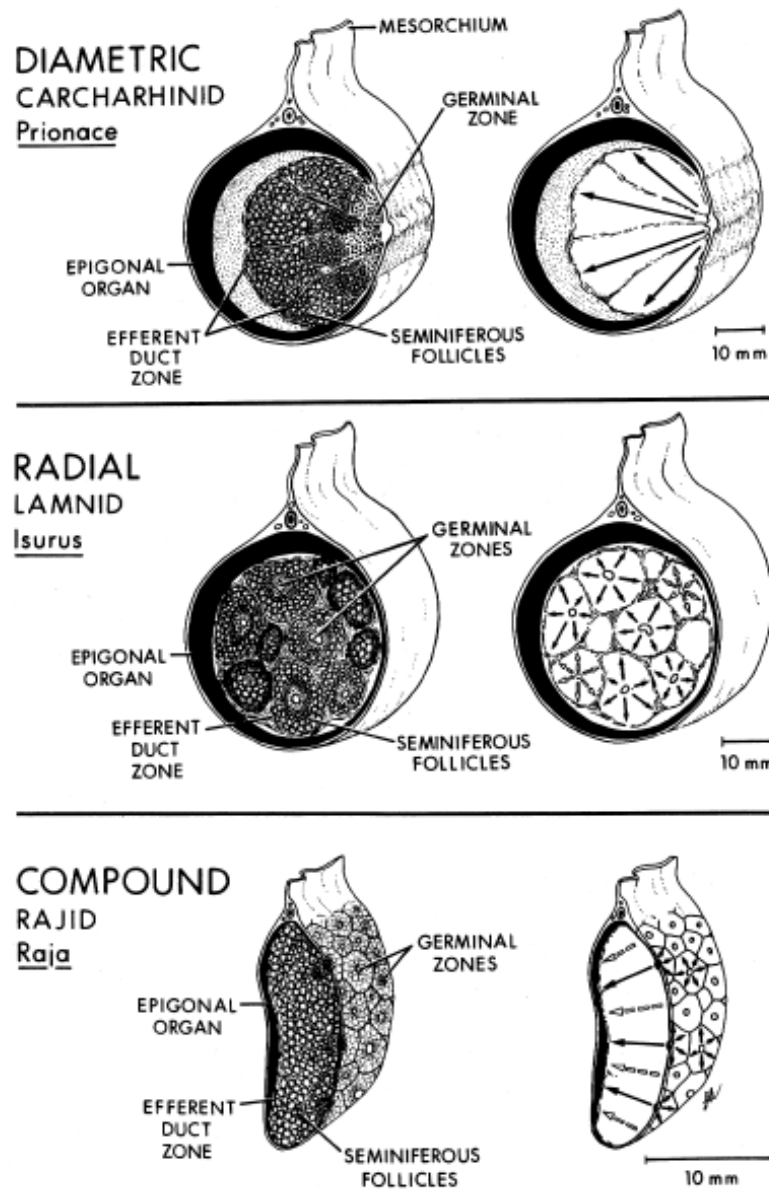
Os três padrões são radial, diametral e composto (Fig. 3), em todos eles, as estruturas presentes no testículo permanecem as mesmas, mudando apenas localização e o sentido percorrido pela produção de espermatozoides no testículo. O tipo radial apresenta este nome por conta da zona germinativa presente no centro do lóbulo, de modo que o desenvolvimento dos folículos caminha do centro do lóbulo em direção à periferia da circunferência, onde estão presentes os ductos eferentes que coletam os espermatozoides à medida que amadurecem; este padrão testicular foi descrito a ordem Lamniformes, como exemplo o tubarão-mako, *Isurus oxyrinchus* (CONDE-MORENO; GALVÁN-MAGAÑA, 2006).

O tipo diametral é apresentado por tubarões da família Carcharhinidae, como as espécies *Rhizoprionodon porosus* e *R. lalandii* (SILVEIRA, 2019) que apresentam características bem demarcadas deste padrão, como uma única zona germinativa por toda a

extensão do testículo, localizada oposta ao órgão epigonal, de modo que os espermatocistos em maturação atravessam o diâmetro do testículo para chegar ao ducto.

Já o tipo composto se caracteriza como uma mistura dos dois tipos anteriores, onde espermatocistos formados nas zonas germinativas presentes na superfície dorsal se irradiam em colunas através do testículo, o ducto se apresenta em oposição as zonas germinativas contendo os folículos; este padrão está presente em espécies da ordem Rajiformes e Myliobatiformes, já tendo sido inclusive descrito em espécies do gênero *Potamotrygon* (Myliobatoidei) (PEDREROS-SIERRA; RAMÍREZ-PINILLA, 2015).

Figura 4 - Representação de três tipos de estruturas testiculares. Setas indicam o sentido percorrido pela produção de espermatozoides no testículo.



Fonte: PRATT (1988).

Após a produção no testículo, os espermatozoides passam ao epidídimo, próximo órgão do sistema reprodutivo (YOSHIDA; ASTURIANO, 2020). A maturação de espermatozoides e estocagem no epidídimo de peixes cartilagosos são considerados passos prévios importantes para a ativação da motilidade espermática ser bem-sucedida; através de avaliação dos parâmetros de motilidade espermática durante o transporte espermático ao longo do trato reprodutivo masculino, é possível observar que os espermatozoides são imóveis no testículo e adquirem motilidade após a passagem pelo epidídimo (DZYUBA *et al.*, 2019).

Alguns autores consideram características do epitélio do epidídimo semelhantes às do segmento inicial do epidídimo de mamíferos, devido a estrutura e posição do sistema de ductos, outros o diferem dos ductos dos amniotas por serem inteiramente revestidos por um epitélio ciliado. A região proximal do ducto do epidídimo está intimamente envolvida na maturação e preparação dos espermatozoides para o armazenamento a partir de secreção de proteínas (STANLEY, 1963; JONES; JONES, 1982; JONES, 2002).

A glândula de Leydig, foi descrita por Jones e Jones (1982) associada a porção final do epidídimo e ao ducto deferente, como uma glândula ramificada conectada ao segmento inicial do epidídimo, nela, algumas células demonstraram especialização em secreção de proteínas, podendo estar relacionadas aos elevados níveis de proteínas presentes nos fluidos seminais.

Esta estrutura foi também observada em raias de água doce, como a raia cururu, *Potamotrygon wallacei* e para *Potamotrygon motoro*, localizadas em sequência a porção final do epidídimo (MORALES-GAMBA, 2018; DZYUBA *et al.*, 2019). Para *P. magdalenae*, a glândula de Leydig foi descrita como um conjunto de unidades glandulares constituídas, ora por epitélio simples cuboidal ou colunar, ora por epitélio colunar pseudoestratificado, as unidades são circundadas por uma camada muito fina de fibras de colágeno e fibroblastos e, externamente, é revestida por uma cápsula de tecido conjuntivo (PEDREROS-SIERRA; RAMIREZ-PINILLA, 2015).

Os espermatozoides da raia de água doce *P. motoro*, após tornarem-se maduros após o trânsito através do epidídimo, e a passagem pela glândula de Leydig, são armazenados em um estado móvel na vesícula seminal (DZYUBA *et al.*, 2019).

1.5 Espermatogênese em Elasmobrânquios

A espermatogênese consiste na transição de uma célula germinativa masculina, desde espermatogônias, espermatócitos e espermátides até espermatozoides. Este processo se inicia na zona germinativa com uma espermatogônia e uma única célula de Sertoli formando um

espermatocisto, e ocorre independentemente da diferença morfológica na estrutura de testículos, onde existe um padrão de desenvolvimento comum (GRIER, 1992; YOSHIDA, ASTURIANO, 2020).

Conforme ocorre a espermatogênese, os espermatocistos, que contêm células germinativas em diferentes estágios de maturação, irradiam espacialmente da zona germinativa de acordo com um dos três padrões: composto (principalmente Batoidea), radial (Lamniformes) ou linear (principalmente Squalomorphii, Galeomorphii e Holocephali) (YOSHIDA, ASTURIANO, 2020).

Associadas as células germinativas, se encontram as células de Sertoli, célula somática que acompanham a linhagem de células germinativas durante toda a espermatogênese; esta célula apresenta diversas modificações, incluindo migração e modificações morfológicas de seus núcleos e o aumento do citoplasma, sendo assim, cada compartimento germinativo se desenvolve a partir de uma célula germinativa, a espermatogônia primária, associada a células de Sertoli, célula somática (GRIER, 1992; ZAIDEN *et al.*, 2010).

O desenvolvimento do espermatocisto e da espermatogênese são semelhantes em elasmobrânquios, as diferenças entre os estágios tem como base a conformação das células germinativas no tecido, e o caminhar do desenvolvimento dos espermatocistos que contem, desde células em desenvolvimento inicial confinadas a zona germinativa, até células em desenvolvimento avançado, com a observação de espermatozoides, que podem estar dispostos livremente ou contidos no espermatocisto, caracterizados por alta compactação da cabeça (núcleo), correspondendo aos últimos estágios de maturação (PARSONS; GRIER, 1992; ZAIDEN *et al.*, 2010; PEDREROS-SIERRA; RAMIREZ-PINILLA, 2015).

A estrutura formada pelos cistos de células germinativas em estágio avançado de desenvolvimento, os espermatozoides, pode variar entre espécies e grupos. Uma dessas estruturas, o espermatozeugmata, consiste em uma massa formada por matriz seminal no centro, com cabeças de espermatozoides embutidas nela com caudas voltadas para fora da massa, essa conformação se diferencia significativamente dos espermatóforos, estruturas que formam feixes laterais separados por matriz seminal e presença de vesículas em seu interior. A primeira estrutura já foi descrita para espécies de raias da ordem Rajiformes, enquanto a segunda está presente, por exemplo em peixes cartilagosos, subclasse Holocephali, como *Callorhinchus milii* (JONES *et al.*, 2005).

1.6 Fases de Maturação Sexual

Para a classificação dos fases de maturação, são utilizados os aspectos macro e histológicos dos testículos, as características macroscópicas levam em consideração tamanho, formato e coloração dos órgãos do trato; como exemplo, os testículos em animais imaturos podem ser observados apenas como uma pequena massa de tecido esbranquiçado ou uma faixa clara na superfície do órgão epigonal, já para animais adultos e desenvolvidos, os testículos podem variar consideravelmente de tamanho durante o ano e as estações, aumentando durante a estação de reprodução, e diminuindo em outras épocas (CARRIER; PRATT; CASTRO, 2004).

A forma mais detalhada de se caracterizar o desenvolvimento testicular durante a reprodução é através de cortes histológicos do testículo (CONRATH, 2005). Os aspectos histológicos, como as mudanças no epitélio, ducto e tipos celulares nos órgãos são características utilizadas para a classificação de fases reprodutivas, dados que são as bases para a determinação de maturidade sexual em elasmobrânquios (PEDREROS-SIERRA; RAMÍREZ-PINILLA, 2015).

Para a classificação de fases de maturação testicular relacionando as características histológicas dos testículos, Acero *et al.* (2008) realizaram a escala de desenvolvimento de raias marinhas, onde foram classificadas nove fases de maturação, que levam em consideração os tecidos conjuntivo e germinativo, e as células encontradas em cada um. A primeira fase é marcada pela presença unicamente de espermatogônias no tecido germinativo, enquanto a segunda e terceira consideram o aumento do número de espermatogônias e o aumento do diâmetro dos cistos formados pelas células de Sertoli.

A quarta fase é agora marcada por espermatocistos com tamanho diminuído e cromatina altamente condensada. Quinta, sexta e sétima fases são marcadas pela presença e diferenciação das espermátides; na oitava fase já são considerados os espermatozoides formados, para assim, na nona e última fase, onde formam cistos agora chamados espermatozeugmata, serem liberados, a espermição (ACERO *et al.*, 2008).

Quando associados as características macroscópicas e microscópicas dos órgãos, é possível realizar a classificação, também, de raias de água doce, como realizado por Pedreros-Sierra e Ramírez-Pinilla (2015), que chegaram as seguintes fases: imaturo, em maturação, maduro ativo e maduro em descanso (tabela 1). Essa classificação é utilizada por outros autores na classificação de fases de raias de água doce da família Potamotrygonidae atualmente (MARCON *et al.*, 2021) e é a classificação utilizada nos seguintes capítulos neste estudo.

Tabela 1 - Estágios de maturação do trato reprodutivo de raias de água doce.

Estágio	Características Macroscópicas	Características Histológicas
Imaturo	<p>Testículos: lóbulos redondos e pequenos; hialinos ou avermelhados, organizados em uma fileira na região dorsal do órgão epigonal.</p> <p>Epidídimo: ducto filiforme; não é possível diferenciar as regiões (cabeça, corpo e cauda).</p> <p>Glândula de Leydig: hialina, ligeiramente mais larga que o epidídimo e a vesícula seminal; superfície lisa.</p> <p>Vesícula seminal: hialina, reta e ducto filiforme.</p>	<p>Testículos: lóbulos contendo papilas germinativas, zonas espermatogoniais, e às vezes espermátocitos.</p> <p>Epidídimo: Cabeça: epitélio colunar pseudoestratificado; Corpo e cauda: epitélio cuboidal simples com superfície recortada. As secreções são evidentes em todo o epidídimo e, ocasionalmente, as células epiteliais são destacadas e dispersas no lúmen.</p> <p>Ducto deferente: epitélio colunar pseudoestratificado ou simples cuboidal, sem pregas ou apenas insinuado. Ausência de espermatozoides. Secreções escassas. Tecido conjuntivo com abundantes fibras de elastina.</p> <p>Glândula de Leydig: Unidades glandulares simples com epitélio cuboidal; o material secretor e o citoplasma das células epiteliais são escassos. Tecido conjuntivo largo com fibroblastos abundantes e elastina ou unidades glandulares simples com epitélio colunar simples e células epiteliais com aspecto vacuolado. Às vezes, há um amplo suporte de tecido conjuntivo frouxo circundando as unidades glandulares.</p> <p>Vesícula seminal: o epitélio é dobrado, mas ainda não adquiriu uma configuração definida; simples cuboidal a colunar pseudoestratificado. Presente material secretado. Ausência de espermatozoides.</p>
Em maturação	<p>Testículos: lobos pequenos e ovais hialinos ou avermelhados. Organizados em uma linha na região dorsal do órgão epigonal.</p> <p>Epidídimo: só é possível diferenciar a cabeça; avermelhado e ligeiramente mais largo que o resto do órgão.</p> <p>Glândula de Leydig: se apresenta em forma de barril, avermelhada e com superfície lobulada.</p> <p>Vesícula seminal: larga, hialina e ducto reto.</p>	<p>Testículos: lóbulos contendo papilas germinativas, espermatogônias, espermátocitos e espermátides.</p> <p>Epidídimo: O lúmen dos túbulos é muito reduzido e às vezes não visível. As células epiteliais podem estar destacadas e dispersas em o lúmen, é comum a proliferação celular. Espermatozoides individuais podem estar presentes.</p> <p>Duto deferente: epitélio colunar pseudoestratificado, as dobras epiteliais apenas insinuadas. Ausência de espermatozoides. Secreções escassas. Tecido conjuntivo com fibras de elastina abundantes.</p> <p>Glândula de Leydig: unidades glandulares com epitélio colunar simples. Células epiteliais do citoplasma são granuladas e aspecto vacuolado. Cápsula densa de tecido conjuntivo que envolve o tecido glandular. O material secretado é escasso.</p> <p>Vesícula seminal: epitélio cuboidal simples, mas em alguns casos, células destacadas. Espermatozoides escassos e ausência de secreções. Epitélio pode apresentar dobras.</p>
Maduro ativo	<p>Testículos: avermelhados ou de cor creme e lóbulos aumentados; muito próximos um do outro e ocupando toda a região dorsal do órgão epigonal. Órgão epigonal pode estar reduzido.</p> <p>Epidídimo: cabeça, corpo e cauda facilmente distinguíveis. O corpo é altamente enrolado, mais amplo do que a cabeça e a cauda, sua região anterior é branca e sua região posterior é amarelada, enquanto a cabeça é avermelhada.</p> <p>Glândula de Leydig: em forma de barril, avermelhada e superfície lobulada.</p> <p>Vesícula seminal: branca e ducto altamente curvo.</p>	<p>Testículos: lóbulos contendo papilas germinativas, espermatogônias, espermátocitos, espermátides e zonas de espermatozoides.</p> <p>Epidídimo: Cabeça: epitélio colunar pseudoestratificado com estereocílios; Corpo: epitélio simples com células de secretoras (extensão citoplasmática) e aspecto vacuolado; Cauda: epitélio simples com dobras. Tecido conjuntivo denso.</p> <p>Duto deferente: epitélio colunar pseudoestratificado; citoplasma das células epiteliais projetadas no lúmen. Presença de espermatozoides e secreções no lúmen.</p> <p>Glândula de Leydig: unidades glandulares com epitélio colunar pseudoestratificado. Lúmen amplo e grande quantidade de material secretado.</p> <p>Vesícula seminal: paredes finas e lúmen amplo. Epitélio escamoso simples a cuboide dobrado. Tecido conjuntivo com fibras de colágeno abundantes. Lúmen repleto de espermatozoides, espermatozeugmas e secreções.</p>
Maduro em descanso	<p>Testículos: lóbulos pequenos, arredondados e amarelos; parcialmente cobertos pelo órgão epigonal ou formando um feixe.</p> <p>Epidídimo: cabeça, corpo e cauda facilmente distinguíveis; todos são uniformes em espessura. O corpo é ligeiramente enrolado, sua região anterior é branca e sua região posterior é amarelada. O cabeça é avermelhada.</p> <p>Glândula de Leydig: em forma de barril, avermelhada ou amarelada, e com uma superfície lobulada.</p> <p>Vesícula seminal: ducto branco e altamente curvado.</p>	<p>Testículos: lóbulos contendo zonas germinais, espermatogônias, espermátocitos (em alguns casos) e espermatozoides.</p> <p>Epidídimo: o epitélio é como o estágio ativo, mas a camada de tecido conjuntivo está solta (abundantes fibroblastos e espaço intercelular) e mais larga e o lúmen dos túbulos é mais reduzido.</p> <p>Glândula de Leydig: unidades glandulares com epitélio colunar simples. Células epiteliais de aspecto vacuolado. O material secretor é escasso ou vazio.</p> <p>Vesícula seminal: estrutura como a do ducto deferente. Espermatozoides individuais presentes. A atividade secretora foi reduzida.</p>

Fonte: Pedreros-Sierra e Ramírez-Pinilla (2015).

O órgão epigonal também é um órgão que apresenta modificações durante as fases de maturação em elasmobrânquios, assim como em diferentes fases de crescimento, variando sua composição celular, formato, tamanho e coloração. Para animais juvenis, o órgão epigonal em elasmobrânquios pode se mostrar em formato de fita longa e espessa e sem coloração, enquanto em adultos, é um órgão largo de coloração esbranquiçada (BRUNO, 2016).

Para outros órgãos, as variações de acordo com o período reprodutivo também são visíveis, como para a zona degenerada presente nos testículos que contem cistos rompidos após a liberação de células germinativas para o lúmen dos ductos, e que varia sua posição e tamanho no órgão de acordo com a estação, onde pode ser observada entre regiões de espermatogônias em determinadas estações, e em outras separando regiões onde estão presentes espermátócitos primários (JONES; JONES, 1982).

REFERÊNCIAS

ACERO, P.; GRIJALBA-BENDECK, M.; MORENO, F.; ACEVEDO, K.; GONZÁLEZ, E. Histología comparada del sistema reproductivo de cuatro especies de rayas caribenhas (Chondrichthyes: Batoidea). **Rev. Acad. Colomb. Cienc.** V. 32, n. 125, p. 581-596, 2008.

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

BRUNO, C. E. M. Desenvolvimento embrionário dos órgãos linfóides do Tubarão-azul, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758), Elasmobranchii, Carcharhiniformes. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2016.

BURGOS-VÁZQUEZ, M. I.; GALVÁN-MAGAÑA, F.; CARRERA-FERNÁNDEZ, M.; OCHOA-BÁEZ, R. I.; ODDONE, M. C. Reproductive characteristics and reproductive tract anatomy of the California butterfly ray *Gymnura marmorata* (Myliobatiformes: Gymnuridae). **Journal of fish biology**, n. 95, v. 2, p. 490-501, 2019.

CARRIER, J. C.; PRATT, H. L.; CASTRO, J. I. Reproductive biology of elasmobranchs. In: *Biology of sharks and their relatives*, CRC PRESS, v. 10, p. 269-286, 2004.

CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M. L. G.; ROSA, R. S.; RINCÓN, G. Neotropical freshwater stingrays: diversity and conservation status. **Shark News**, v. 14, p. 47-51, 2002.

CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M.L.G.; ALMEIDA, M.P. Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon basin. **J. Northwest Atl. Fish Sci.** n. 35, p. 165–171, 2005.

COMPAGNO, L. J. V.; COOK, S. D. The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. *The Biology of Freshwater Elasmobranchs, a Symposium to Honor Thomas B. Thorson*. **Journal of Aquaculture & Aquatic Sciences**. v. 2, p. 62-90, 1995.

CONDE-MORENO, M.; GALVÁN-MAGAÑA, F. Reproductive biology of the mako shark *Isurus oxyrinchus* on the south-western coast of Baja California, Mexico. **Cybium**, v. 30, n. 4, p. 75-83, 2006.

CONRATH, C. L. Reproductive biology. In: MUSICK, J. A.; BONFIL, R. Management techniques for elasmobranch fisheries. No. 474, Roma, Food & **Agriculture Org.**, cap. 7, p. 103-126, 2005.

CRUZ, V. P. D.; NOBILE, M. L. O.; PAIM, F. G.; ADACHI, A. M. C. D. L.; RIBEIRO, G. D. S.; FERREIRA, D. C.; PANSONATO-ALVES, J. C.; CHARVET, P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Cytogenetic and molecular characteristics of *Potamotrygon motoro* and *Potamotrygon* sp.(Chondrichthyes, Myliobatiformes, Potamotrygonidae) from the Amazon basin: Implications for the taxonomy of the genus. **Genetics and molecular biology**, v. 44, 2021.

DZYUBA, V.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; KAHANEC, M.; VERISSIMO-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 of Zoology**. n. 307, p. 9-16, 2018.

DZYUBA, V.; SAMPELS, S.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; KAHANEC, M.; VERISSIMO-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**. n. 130, p. 26- 35, 2019.

DZYUBA, V.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; RODINA, M.; DZYUBA, B. Sperm antioxidant system in ocellate river stingray *Potamotrygon motoro* at transition from seminal vesicle to cloaca. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1975-1980, 2020.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; VAN DER LAAN, R. Eschmeyer's Catalog of Fishes: Genera, Species, References. Electronic version accessed 30. 05.2021. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). 2021.

GARRONE-NETO, D.; HADDAD Jr, V.; VILELA, M. J. A.; UIEDA, V. S. Registro de ocorrência de duas espécies de potamotrigonídeos na região do Alto Rio Paraná e algumas considerações sobre sua biologia. **Biota Neotropica**. v. 7, n. 1, 2007.

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, 2010.

GARRONE-NETO, D., HADDAD JR, V. Arraias em rios da região Sudeste do Brasil: locais de ocorrência e impactos sobre a população. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 43, v. 1, p. 82-88, 2010.

GARRONE-NETO, D.; HADDAD Jr.; GADIG, O. B. F. Record of ascending passage of potamotrygonid stingrays through navigation locks: implications for the management of non-

native species in the Upper Paraná River basin, Southeastern Brazil. **Management of Biological Invasions**, p. 113-119, 2014.

GIRARD, M.; RIVALAN, P.; SINQUIN, G. Testis and sperm morphology in two deep-water squaloid sharks, *Centroscyrnus coelolepis* and *Centrophorus squamosus*. **Journal of Fish Biology**, v. 57, n. 6, p. 1575-1589, 2000.

GRIER, H. J. Chordate testis: the extracellular matrix hypothesis. **Journal of Experimental Zoology**, v. 261, n. 2, p. 151-160, 1992.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE – ICMBio. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VI - Peixes. In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, org. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. 1a ed. Brasília: ICMBio, 2018.

IUCN 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-1. <https://www.iucnredlist.org>. Downloaded on 05 junho 2021,

JONES, N.; JONES, R. C. The structure of the male genital system of the Port Jackson shark, *Heterodontus portujacksoni*, with particular reference to the genital ducts. **Australian Journal of Zoology**, v. 30, n. 4, p. 523-541, 1982.

JONES, R. C. Evolution of the vertebrate epididymis. In: **The epididymis: from molecules to clinical practice**, Plenum Publishers, p. 11-33, 2002.

JONES, C. J.; WALKER, T. I.; BELL, J. D.; REARDON, M. B.; AMBROSIO, C. E.; ALMEIDA, A.; HAMLETT, W. C. Male genital ducts and copulatory appendages in chondrichthyans. *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Batoids and Chimaeras*, ed. WC Hamlett, p. 361-393, 2005.

KIRCHHOFF, K. N.; HAUFFE, T.; STELBRINK, B.; ALBRECHT, C.; WILKE, T. Evolutionary bottlenecks in brackish water habitats drive the colonization of fresh water by stingrays. **Journal of evolutionary biology**, n. 30, v. 8, p. 1576-1591, 2017.

LESSA, R.; SANTANA, F. M.; RINCÓN, G.; GADIG, O. B. F.; EL-DEIR, A. C. A. Biodiversidade de Elasmobrânquios do Brasil. Relatório para o Programa Nacional de Diversidade Biológica (PRONABIO)–Necton–Elasmobrânquios, Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal (MMA). 1999.

LOBODA, T. S.; CARVALHO, M. R. D. 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**, v. 11, p. 693-737, 2013.

LOBODA, T. S.; SILVA, J. P. C. B.; FONTENELLE, J. P.; CARVALHO, M. R. Catálogo de especies: *Potamotrygon amandae*. In LASSO, C. A.; ROSA, R.; MORALES-BETANCOURT, M. A.; GARRONE-NETO, D.; CARVALHO, M. R. (eds), *Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica*. Instituto Humboldt, Bogotá, 2016.

MARCON, J. L.; MORALES-GAMBA, R. D.; BARCELLOS, J. F. M.; ARAÚJO, M. L. G. Sex steroid hormones and the associated morphological changes in the reproductive tract of free-living males of the cururu stingray *Potamotrygon wallacei*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 309, p. 11378, 2021.

MOYA, A. C. Biología reproductiva de dos especies de rayas del golfo San Matías: la raya platana *Atlantoraja platana* y la raya marmorada *Sympterygia bonapartii*. Un enfoque morfofuncional. Universidad nacional del sur. Tese de doutorado em biologia, Argentina, 2017.

NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, 2016.

ODDONE, M. C.; VELASCO, G.; CHARVET, P. Record of the freshwater stingrays *Potamotrygon brachyura* and *P. motoro* (Chondrichthyes, Potamotrygonidae) in the lower Uruguay River, South America. **Acta Amazonica**, n. 42, v. 2, p. 299-304, 2012.

OTA, R. R.; DEPRÁ, G. D. C.; GRAÇA, W. J. D.; PAVANELLI, C. S. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes: revised, annotated and updated. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, 2018.

PAGLIARINI, C. D.; DA SILVA RIBEIRO, C.; SPADA, L.; DELARIVA, R. L.; CHAGAS, J. M. A.; DOS ANJOS, L. A.; RAMOS, I. P. Trophic ecology and metabolism of two species of nonnative freshwater stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **Hydrobiologia**, v. 847, n. 13, p. 2895-2908, 2020.

PALMEIRA-NUNES, A. R. O.; RINCON, R.; ROSA, R. S.; NUNES, J. L. S. ReproduCtive Biology of the stingray *Hypanus marianae*, an endemic species from Southwestern Tropical Atlantic Ocean. **Revista Nordestina de Biologia**. v. 27, n. 1, 2019.

PARSONS, G. R.; GRIER, H. J. Seasonal changes in shark testicular structure and spermatogenesis. **Journal of Experimental Zoology**, v. 261, n. 2, p. 173-184, 1992.

PEDREROS-SIERRA, T. M.; RAMÍREZ-PINILLA, M. P. Morphology of the reproductive tract and acquisition of sexual maturity in males of *Potamotrygon magdalenae* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). **Journal of morphology**, v. 276, n. 3, p. 273-289, 2015.

PIERCY, A.; GELSLEICHTER, J.; SNELSON, F. F. Morphological and histological changes in the genital ducts of the male Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*, during the seasonal reproductive cycle. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 29, n. 1, p. 23-35, 2003.

POULAKIS, G. R.; GRIER, H. J. Ontogenetic testicular development and spermatogenesis in rays: the cownose ray, *Rhinoptera bonasus*, as a model. **Environmental biology of fishes**, v. 97, n. 9, p. 1013-1029, 2014.

PRATT JR, H. L. Elasmobranch gonad structure: a description and survey. **Copeia**, p. 719-729, 1988.

RINCON, G. Aspectos taxonômicos, alimentação e reprodução da raia de água doce *Potamotrygon orbignyi* (Castenau) (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) no rio Paraná-

Tocantins. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências de Rio Claro. Rio Claro, São Paulo, Brasil, 2006.

RINCON, G.; SOARES, C. E. S.; LEITE, R. D.; PEREIRA, K. M.; WOSNICK, N.; PALMEIRA-NUNES, A. R. O.; NUNES, J. L. S. Dimorfismo sexual da raia de água doce *Potamotrygon motoro* dos lagos de Viana, Maranhão. **Tópicos Integrados de Zoologia**. Ponta Grossa: Editora Atena, p. 15-25, 2019.

ROSA, R. S. A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Dissertation for the degree of doctor of philosophy, College of William and Mary Virginia, Faculty of the School of Marine Science. p. 523, 1985.

ROSA, R. S.; CHARVET-ALMEIDA, P.; QUIJADA, C. C. D. Biology of the South American potamotrygonid stingrays. **Sharks and their relatives II: biodiversity, adaptive physiology, and conservation**. CRC Press, Boca Raton, p. 241-281, 2010.

SADO, R. Y.; SOUZA, F. C.; BEHR, E. R.; MOCHA, P. R. E.; BALDISSEROTTO, B. Anatomy of Teleosts and elasmobranchs. In: **Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish**. Academic Press, p. 21-47, 2020.

SILVEIRA, L. Estudo morfofisiológico da estratégia reprodutiva em duas espécies de *Rhizoprionodon* sp. capturados na costa do Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil. 2019.

STANLEY, H. P. Urogenital morphology in the chimaeroid fish *Hydrolagus colliei* (Lay and Bennett). **Journal of Morphology**, v. 112, n. 2, p. 99-127, 1963.

STANLEY, H. P. The structure and development of the seminiferous follicle in *Scyliorhinus caniculus* and *Torpedo marmorata* (Elasmobranchii). **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 75, n. 2, p. 453-468, 1966.

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

VAZZOLER, A. E. A. M. Manual de métodos para estudos biológicos de populações de peixes: Reprodução e crescimento. Brasília, CNPq. Programa Nacional de Zoologia. p. 106, 1981.

VAZZOLER A. E. A. M. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. EDUEM, Maringá, 1996.

VILELA, M.J.A.; FRANCO, R.A.M.; ALMEIDA, N.V.A. Monitoramento da pesca no reservatório de Porto Primavera (UHE Engº Sérgio Motta), no Rio Paraná. Relatório Final (Agosto/2000-Novembro/2003), CESP/FAPEC/UFMS, Três Lagoas, 2004.

WEHITT, A.; COLONELLO, J. H.; MACCHI, G. J.; GALÍNDEZ, E. J. Reproductive biology of the eyespot skate *Atlantoraja cyclophora* (Elasmobranchii: Arhynchobatidae) an endemic

species of the Southwestern Atlantic Ocean (34°S-42°S). **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 2, 2018.

WOURMS, J. P. Reproduction and Development in Chondrichthyan Fishes. **Ameri. Zool.** v. 17, p. 379-410, 1977.

ZAIDEN, S. F., BRINN, R. P., MARCON, J. L., & URBINATI, E. C. Testicular structure and spermatogenesis of Amazonian freshwater cururu stingray *Potamotrygon cf. histrix*. **Zygote**, p. 245-253, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo serve de subsídio para a compreensão da biologia reprodutiva masculina de *Potamotrygon amandae* considerando que cada órgão do trato reprodutivo desempenha um papel na formação, maturação e estocagem dos gametas que está diretamente relacionado a sua morfologia e estruturas.

Estocagem no epidídimo e a passagem pelos demais órgãos onde existe a produção de secreções, são importantes passos para ativação dos espermatozoides e qualidade espermática, podendo estar relacionadas a função desta secreção liberada para a luz dos ductos, demonstrando a importância desta secreção na reprodução da espécie.

O testículo de *Potamotrygon amandae* é lobular e apresenta a zona germinativa composta por espermatocistos onde ocorre espermatogênese e estão presentes estruturas como os espermatoblastos, que contém as células de Sertoli observadas no epitélio, e se modificam conforme a linhagem germinativa, resultando na proliferação de células e espermatocistos.

As células germinativas se mantem dentro dos cistos até a formação dos espermatozoides ao final da espermiogênese e processo de diferenciação, alongamento e espiralamento do núcleo e cauda das espermátides. Esta foi a primeira descrição histológica da espermatogênese da espécie.