



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 Jupia, 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 (espermátogônias, 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 Jupia 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 invited to 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 discover 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 spermatid 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 raia e tubarões existentes dentro de dois clados conhecidos, a divisão Selachii, que abrange os tubarões, e a divisão Batomorphi (as raia 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 cartilaginosos, e que as raia, 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 arraia *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 raia são capturadas como parte do recurso alimentar de populações em regiões de baixa drenagem; as populações de raia 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 raia do gênero *Potamotrygon*, que se dispersaram rapidamente para esse novo ambiente (GARRONE-NETO *et al.*, 2007).

A ocorrência de três espécies de raia 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 raia 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).

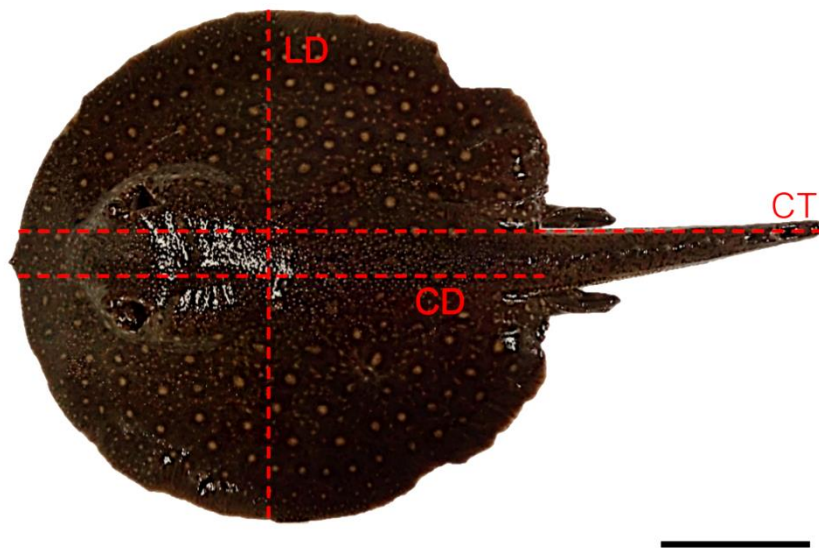
A espécie *Potamotrygon amandae* possui características comparadas as de *P. motoro* (LOBODA; CARVALHO, 2013) de modo que já foi utilizada em lugar de *P. motoro* em trabalhos anteriores (OTA *et al.*, 2018), inclusive em estudos realizados na mesma área deste trabalho, onde *P. amandae* é utilizado 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 cláasper 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).

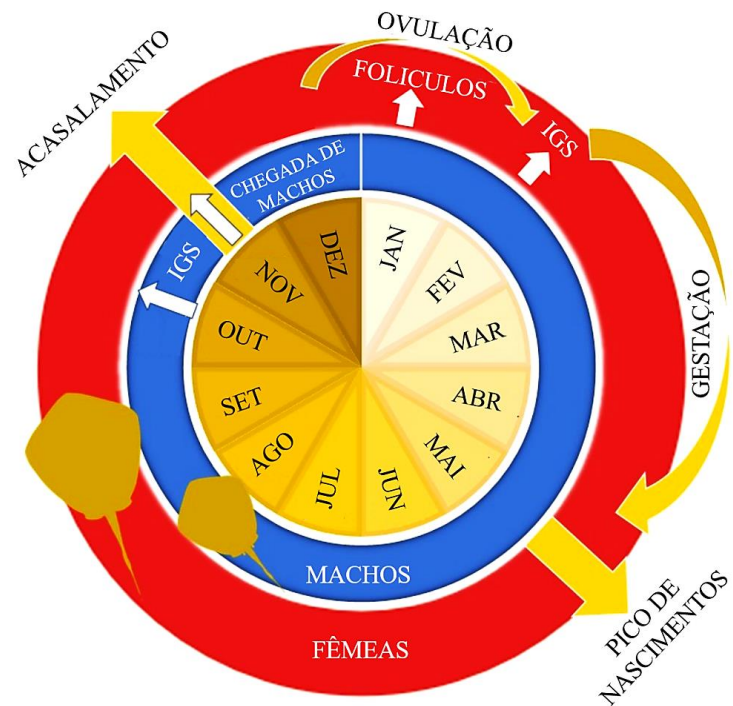
Outras espécies de raias marinhas também apresentam a reprodução para os últimos meses do ano, *Dasyatis sabina* (Myliobatiformes, Dasyatidae) ou Raia do Atlântico, possui espermatogênese tardia entre os meses de outubro a novembro, dados muito próximos dos observados para outra espécie tropical marinha *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 wallacei*, presente no médio Rio Negro, norte do país. Esta correlação também é verificada nos valores de IGS, pois os machos de *P. wallacei* 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.

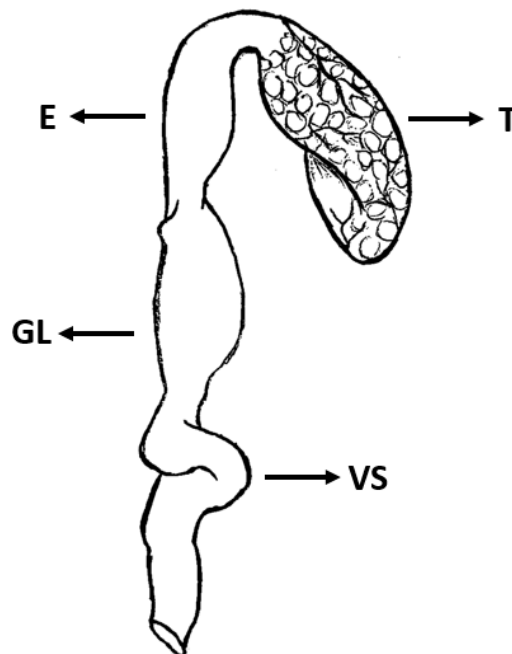
1.4 Morfologia do Trato Reprodutivo Masculino

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).

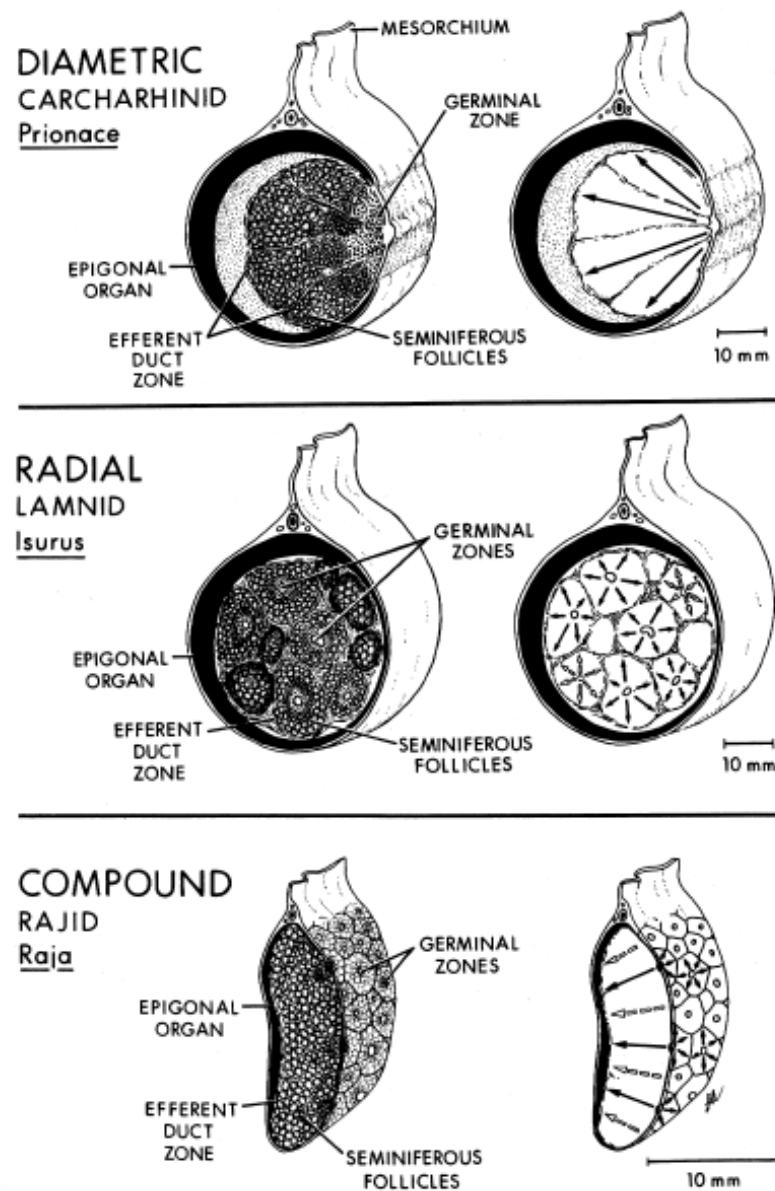
Os três padrões são radial, diametral e composto (Fig. 3), em todos eles, as estruturas presentes no testículo permanecem as mesmas, mudando apenas localização e o sentido percorrido pela produção de espermatozoides no testículo. O tipo radial apresenta este nome por conta da zona germinativa presente 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 cartilaginosos 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 raia 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

espermatozoides, 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 espermatozoides, 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 espermatozoides e da espermatogênese são semelhantes em elasmobrânquios, as diferenças entre os estágios tem como base a conformação das células germinativas no tecido, e o caminho do desenvolvimento dos espermatozoides 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 espermatozoides, 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 cartilaginosos, subclasse Holocephali, como *Callorhynchus milii* (JONES *et al.*, 2005).

1.6 Fases de Maturação Sexual

Para a classificação das 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 raia de água doce.

Estágio	Características Macroscópicas	Características Histológicas
Imaturo	Testículos: lóbulos redondos e pequenos; hialinos ou avermelhados, organizados em uma fileira na região dorsal do órgão epigonal. Epidídimo: ducto filiforme; não é possível diferenciar as regiões (cabeça, corpo e cauda). Glândula de Leydig: hialina, ligeiramente mais larga que o epidídimo e a vesícula seminal; superfície lisa. Vesícula seminal: hialina, reta e ducto filiforme.	Testículos: lóbulos contendo papilas germinativas, zonas espermatogoniais, e às vezes espermatócitos. 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. 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. 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. Vesícula seminal: o epitélio é dobrado, mas ainda não adquiriu uma configuração definida; simples cuboidal a colunar pseudoestratificado. Presente material secretado. Ausência de espermatozoides.
Em maturação	Testículos: lobos pequenos e ovais hialinos ou avermelhados. Organizados em uma linha na região dorsal do órgão epigonal. Epidídimo: só é possível diferenciar a cabeça; avermelhado e ligeiramente mais largo que o resto do órgão. Glândula de Leydig: se apresenta em forma de barril, avermelhada e com superfície lobulada. Vesícula seminal: larga, hialina e ducto reto.	Testículos: lóbulos contendo papilas germinativas, espermatogônias, espermatócitos e espermátides. 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. Duto deferente: epitélio colunar pseudoestratificado, as dobras epiteliais apenas insinuadas. Ausência de espermatozoides. Secreções escassas. Tecido conjuntivo com fibras de elastina abundantes. 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. Vesícula seminal: epitélio cuboidal simples, mas em alguns casos, células destacadas. Espermatozoides escassos e ausência de secreções. Epitélio pode apresentar dobras.
Maduro ativo	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. 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. Glândula de Leydig: em forma de barril, avermelhada e superfície lobulada. Vesícula seminal: branca e ducto altamente curvo.	Testículos: lóbulos contendo papilas germinativas, espermatogônias, espermatócitos, espermátides e zonas de espermatozoides. 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. Duto deferente: epitélio colunar pseudoestratificado; citoplasma das células epiteliais projetadas no lúmen. Presença de espermatozoides e secreções no lúmen. Glândula de Leydig: unidades glandulares com epitélio colunar pseudoestratificado. Lúmen amplo e grande quantidade de material secretado. 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.
Maduro em descanso	Testículos: lóbulos pequenos, arredondados e amarelos; parcialmente cobertos pelo órgão epigonal ou formando um feixe. 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. Glândula de Leydig: em forma de barril, avermelhada ou amarelada, e com uma superfície lobulada. Vesícula seminal: ducto branco e altamente curvado.	Testículos: lóbulos contendo zonas germinais, espermatogônias, espermatócitos (em alguns casos) e espermatozoides. 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. Glândula de Leydig: unidades glandulares com epitélio colunar simples. Células epiteliais de aspecto vacuolado. O material secretor é escasso ou vazio. Vesícula seminal: estrutura como a do ducto deferente. Espermatozoides individuais presentes. A atividade secretora foi reduzida.

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 portujsoni*, 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 espécies: *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. *histrrix*. **Zygote**, p. 245-253, 2010.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O estudo teve como objetivo a caracterização morfológica e estrutural dos componentes do trato reprodutivo masculino da raia de água doce *Potamotrygon amandae*, auxiliando desta forma na compreensão da dinâmica da maturação espermatogonial e da reprodução da espécie.

Objetivos específicos

- Descrever a estrutura e morfologia dos órgãos do trato reprodutivo masculino da espécie de raia de água doce *Potamotrygon amandae*.
- Caracterizar a espermatogênese da espécie através de análises de microscopia de luz.

**Capítulo 2 - Estrutura Macro e Microscópica do Trato
Reprodutivo Masculino da Raia de Água Doce *Potamotrygon
amandae* (Myliobatiformes, Potamotrygonidae)**

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Potamotrygon motoro* é uma das mais abrangentes dentro da família Potamotrygonidae, um dos únicos grupos de elasmobrânquios completamente adaptados exclusivamente ao ambiente dulcícola (COMPAGNO; COOK, 1995), ocorrendo em diversos sistemas de água doce na América do Sul, como a Amazônia, Paraná-Paraguai e Uruguai (ROSA, 1985; COMPAGNO; COOK, 1995).

No Rio Paraná, duas espécies de *Potamotrygon* são consideradas sinonímias, *P. amandae* e *P. motoro* (LOBODA; CARVALHO, 2013). Atualmente, muitos estudos tem utilizado *P. amandae* (OTA *et al.*, 2018; PAGLIARINI *et al.*, 2020), tal fato foi corroborado por uma revisão recente do gênero *Potamotrygon*, com base em caracteres moleculares indica a presença de duas espécies de raias no rio Paraná, a *P. amandae* e *P. falknery* (CRUZ *et al.*, 2021).

Populações de *P. amandae* (*P. motoro*) se estabeleceram na região do Alto Rio Paraná, ao final dos anos 1970, favorecidas pelas eclusas existentes nas usinas hidrelétricas instaladas ao longo do Tietê-Paraná; nestes locais as raias não faziam parte das espécies aquáticas nativas, dado que sua população se estabeleceu em um período relativamente recente, e que vem aproveitando a construção de usinas hidrelétricas que contribuem com a colonização no Alto Rio Paraná, expandindo a área de distribuição das novas espécies (GARRONE-NETO *et al.*, 2007).

Vários aspectos da reprodução de potamotrygonídeos vem sendo muito estudados devido à sua importância evolutiva e potencial para a biologia da conservação (CHARVET-ALMEIDA *et al.*, 2005; ZAIDEN *et al.*, 2010; PEDREROS-SIERRA, RAMIREZ-PINILLA, 2015).

Embriologicamente e morfológicamente, Chondrichthyes apresentam o sistema reprodutivo mais semelhante aos anfíbios e amniotas do que peixes teleósteos (WOURMS, 1977), de modo que machos de *P. amandae* (*P. motoro*) apresentam uma estrutura do sistema reprodutivo muito semelhante à de vertebrados superiores (DZYUBA *et al.* 2018).

Apesar de estudos realizados, pouco se sabe sobre os aspectos morfológicos relacionados a reprodução da espécie, e devido a importância do conhecimento que ainda não se tem sobre estas populações e sobre como ocorre a reprodução da mesma neste novo local, o estudo teve como objetivo a caracterização dos componentes do trato reprodutivo masculino da raia de água doce *Potamotrygon amandae*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 10 exemplares machos de *Potamotrygon amandae* foram coletados em novembro de 2017, com auxílio de arpão no reservatório de Jupia, rio Paraná, no município de Ilha Solteira, São Paulo, Brasil (20° 25' 52" Sul, 51° 20' 17" Oeste) (autorização SISBIO nº 58102-1). Os animais coletados foram mantidos no Laboratório de Ictiologia Neotropical, LINEO, Departamento de Biologia e Zootecnia, UNESP, Ilha Solteira, SP, Brasil.

Os espécimes foram anestesiados com uma solução de MS 222, sob o protocolo do Comitê de Ética e Uso Animal (CEUA-FEIS/UNESP 14/2018). Após pesagem e medição dos animais, os sítios do trato reprodutivo (testículo, epidídimo, glândula de Leydig e vesícula seminal), foram removidos e fragmentos fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sorensen, 0,1M a pH 7,2. O lado direito do trato de todos os órgãos foi fragmentado em três partes: início, meio e final do órgão e incluído em resina; o lado esquerdo incluído inteiro em paraplast. Para a confecção das lâminas histológicas, o material foi submetido a cortes de 3µm de espessura, corados em Metanil Yellow + PAS, Reticulina e Azul de Toluidina + Bórax, e fotomicrografados em microscópio Zeiss – AXIOCAM-MRC5.

3. RESULTADOS

3.1 Estrutura Macroscópica do Trato Reprodutivo Masculino

O trato reprodutivo de *Potamotrygon amandae* é composto externamente por um par de cláspers (Fig. 3A e B) e internamente por testículos, epidídimos, glândulas de Leydig e vesículas seminais, todos órgãos pares. Os órgãos se encontram na cavidade celomática na parte ventral do corpo (Fig. 3B e 4A), próximos a abertura da cloaca.

Os testículos se encontram separados do restante dos órgãos do trato reprodutivo por uma membrana fina e hialina de mesentério (Fig. 4A-C), e estes, localizados próximos aos rins, que se situam na parte dorsal da cavidade celomática. Ambos os testículos se apresentam funcionais e não há diferença significativa de tamanho entre os mesmos, sendo muito vascularizados. Os testículos exibem lóbulos testiculares e zonas germinativas bem demarcados e possíveis de observar macroscopicamente; lóbulos ovais ou arredondados, amarelados ou translúcidos, circundados por uma coloração mais escura avermelhada (Fig. 4C).

Os testículos estão justamente envolvidos por uma estrutura translúcida a olho nu que encobre todo o órgão, denominada órgão epigonal, assemelhando-se a um único órgão; o órgão

epigonal, ou órgão linfomielóide, não apresenta coloração em sua extensão, assim, e por conta de sua justaposição, este órgão não se apresentou visível macroscopicamente. Os testículos se ligam ao epidídimo na porção cranial do órgão.

O epidídimo é um órgão alongado e coloração avermelhada tem a parte cranial mais avantajada (Fig. 4D). Nos indivíduos adultos o epidídimo se apresentou dividido em cabeça, corpo e cauda, a última se apresenta menos robusta e é o sítio de ligação entre epidídimo e glândula de Leydig (Fig. 4E). Estas glândulas, por sua vez, têm a porção cranial mais estreita, e o corpo mais avantajado e alongado de coloração avermelhada; sua porção caudal liga-se diretamente a vesícula seminal.

A vesícula seminal é um órgão longo e curvilíneo, de coloração clara e hialina, diferentemente dos outros órgãos do trato (Fig. 4F), e se estende até a abertura da cloaca, sendo o último órgão da parte interna do trato reprodutivo, trato este totalmente separado do sistema urinário.

3.2.1 Testículo

O epitélio germinativo do testículo de *Potamotrygon amandae* se apresenta dividido em zonas, as chamadas zonas germinativas (Fig. 6 A-D), se localizam na porção dorsal do órgão, e são compostas por cistos de células germinativas em desenvolvimento, dos estágios iniciais as mais avançadas, são observados sequencialmente do centro para a extremidade da zona germinativa. mais ao centro e as demais localizadas de dentro para fora destas zonas, onde são encontrados cistos de células em desenvolvimento inicial no interior, e caminhando para a extremidade da zona germinativa, os cistos de células em desenvolvimento mais avançado.

Os cistos contendo células em desenvolvimento mais avançado presentes na periferia das zonas germinativas estão rodeados por uma camada de cistos em degeneração, cistos que continham células germinativas em estado avançado de desenvolvimento, os espermatozoides, e que entram em colapso após a liberação destas células para os ductos, formando uma zona de ampolas degeneradas (Fig. 6 A-D).

A zona degenerada se localiza lateralmente a zona germinativa se posicionando entre ela e os ductos (Fig. 6 C e D), que são observados na porção ventral do órgão, em oposição as zonas germinativas. O ducto é único e em sua passagem pelo órgão está estruturado em formato de serpentina; apresenta um epitélio simples, células com pouco citoplasma e núcleo ovalado, sem indícios de atividade secretora no epitélio (Fig. 7 A e B). O ducto segue longitudinalmente até adentrar o epidídimo.

O lobo testicular é constituído, também, por uma cápsula de epitélio estratificado pavimentoso revestindo o órgão (Fig. 7 C e D), logo após, uma camada pode ser observada, a túnica albugínea, constituída por tecido conjuntivo denso (Fig. 7D).

Em sequência a túnica albugínea, a porção posterior do órgão, a extremidade em contraposição a ligação ao epidídimo, se encontra encoberta pelo órgão epigonal (Fig. 7 A, C e E), não visível a olho nu separadamente do testículo, é um órgão solido, onde podem ser observados plasmócitos, linfócitos e neutrófilos (Fig. 7E). Em machos imaturos compôs a maior parte do testículo (Fig. 8A), enquanto que em machos em desenvolvimento a porção testicular contendo células germinativas tomou a maior parte do testículo (Fig. 8B).

3.2.2 Epidídimo

Em *P. amandae*, o epidídimo é um órgão constituído por uma rede anastomosada de ramificações oriundas do ducto deferente; o ducto se ramifica de modo a formar essa rede intrincada formada por ductos e túbulos, o ducto então, em sua vinda do testículo chega como um canal único, que forma as ramificações no início do órgão, formando uma rede (Fig. 9 A-D), ao se aproximar ao final do órgão, a mesma é gradativamente envolvida pela glândula de Leydig.

Tanto ductos (Fig. 10A) quanto túbulos (Fig. 10E) têm a função de transporte dos espermatozoides pelo epidídimo e são constituídos por um epitélio pseudoestratificado (Fig. 10B) e estratificado colunar (Fig. 10 E-input), respectivamente. O epitélio apresenta células ciliadas voltadas para o lúmen do ducto, chamadas apicais, e células basais, com o núcleo posicionado próximas a lâmina basal, onde se encontram apoiadas (Fig. 10E).

Dentre as células presentes no epitélio, estão presentes células secretoras (Fig. 10 B, C e D), tendo sua base em contato com a lâmina basal; estas células contem vesículas de secreção, também presentes no lúmen dos ductos. As vesículas de secreção apresentam posição basal, próximas a lâmina, e são observadas fortemente coradas pelo reativo de Schif, de coloração rosada, sendo assim possui uma composição baseada em polissacarídeos neutros que podem estar ligados a proteínas e lipídios. A porção central do órgão apresenta função secretora mais ressaltada que as porções inicial e final (Fig. 11 A-C), apresentando ductos com uma quantidade visivelmente maior de células secretoras com vesículas coradas no citoplasma.

Dando sustentação ao órgão, e as estruturas nele presentes, está o tecido conjuntivo, constituído majoritariamente por fibroblastos e fibras colágenas (Fig. 11 D e E), neste tecido também estão presentes diversos vasos sanguíneos (Fig. 11D).

3.2.2 Glândula de Leydig

A glândula é composta por tecido glandular e o ducto deferente que, ao sair do epidídimo, é gradativamente circundado pelo tecido glandular (Fig. 12 A-D). Quando envolto pela glândula propriamente dita, no início do órgão, o ducto se unifica e se apresenta localizado na periferia do órgão (Fig. 13 A-C). Entre o ducto e o tecido glandular está presente um tecido conjuntivo que é composto, principalmente, por fibras de colágeno e fibroblastos.

Na glândula de Leydig, o ducto é único e localizado na porção periférica do órgão, e apresenta diversas invaginações (Fig. 14A). Na porção inicial do órgão, próxima a ligação ao epidídimo, o epitélio do ducto é pseudoestratificado (Fig. 14B), porém com a passagem pelo órgão e a proximidade da vesícula seminal, ele dá lugar a um epitélio simples (Fig. 14C); em ambos, o epitélio é colunar apoiado sobre a lâmina basal e contém células ciliadas (Fig. 14B e D). Este epitélio pode apresentar células secretoras, com vesículas de coloração PAS+, porém, estas células foram observadas em menor frequência do quando comparado aos ductos do epidídimo.

O tecido glandular é composto por unidades glandulares do tipo tubular ramificada (Fig. 14A). Este tecido glandular é encontrado na porção final do epidídimo, na glândula de Leydig e na porção inicial da vesícula seminal, sempre circundando quase totalmente o ducto deferente.

O epitélio destas unidades é simples colunar, e composto por células com núcleos basais e citoplasma apical, a grande maioria destas células é secretora e é possível observar secreção no lúmen (Fig. 14E, F e G). Cada unidade glandular é circundada por células mioepiteliais em contato com a lâmina basal, que tem a função de contração, de modo a comprimir a glândula e realizar a expulsão da secreção para o lúmen, de onde será encaminhado para o ducto (Fig. 14 E e F).

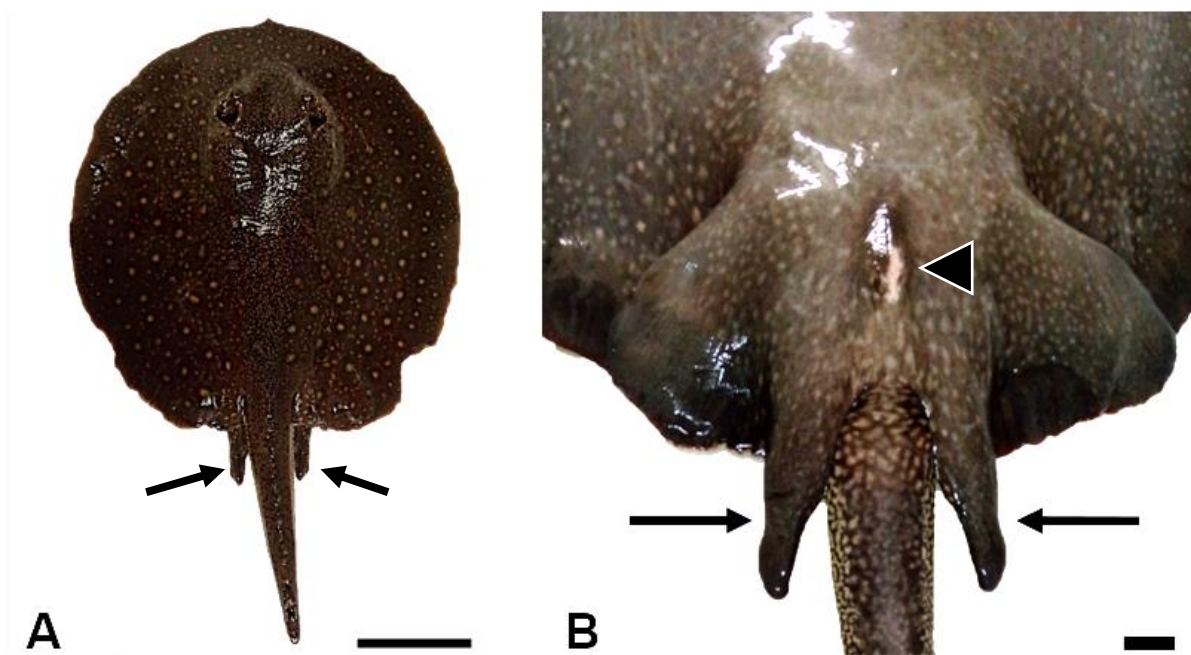
3.2.3 Vesícula Seminal

A vesícula seminal, assim como os outros órgãos, é composta pelo ducto deferente localizado no centro do órgão, e formado por diversas dobras, estas dobras ficam mais acentuadas na porção final do órgão, com invaginações mais compridas e de luz mais estreita, diferentemente do início do órgão, onde o ducto apresenta invaginações mais curtas e a luz do ducto mais ampla (Fig. 15 A-C). Longitudinalmente, é possível ver a estrutura em espiral do ducto, de modo que ele se projeta em formação de curvas por todo o órgão (Fig. 16 A e B).

Neste órgão, o ducto possui um epitélio simples colunar com células ciliadas apoiadas sobre a lâmina basal (Fig. 17A). Apesar de o órgão não possuir função secretora, algumas células do epitélio do ducto apresentaram secreção PAS+ no citoplasma (Fig. 17B), assim como secreção encontrada no lúmen do ducto.

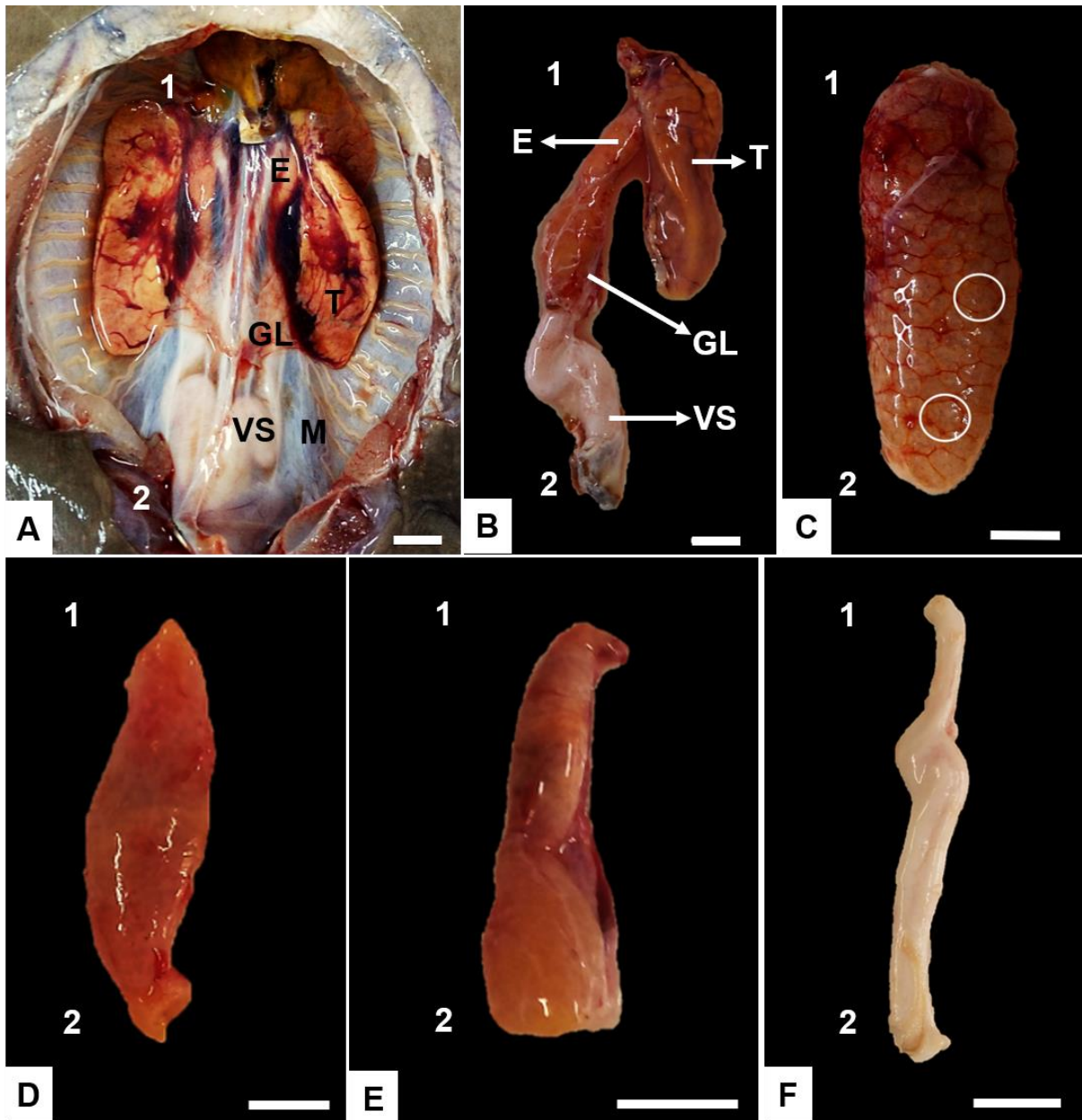
Vasos sanguíneos foram observados dispersos pelo tecido conjuntivo que envolve o ducto, inclusive no tecido encontrado entre as dobras, este tecido envolve todo o epitélio e é composto por duas túnicas distintas de tecido conjuntivo, a primeira, túnica média, se encontra entorno do epitélio do ducto, é composta por células musculares e fibras colágenas; a segunda, corresponde a túnica albugínea, o revestimento externo do órgão, composta principalmente por fibroblastos e fibras colágenas em tecido conjuntivo não modelado (Fig. 17 C e D). A túnica média, composta por musculo liso, tem importante papel contrátil na injeção do sêmen armazenado no órgão para a cloaca.

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.



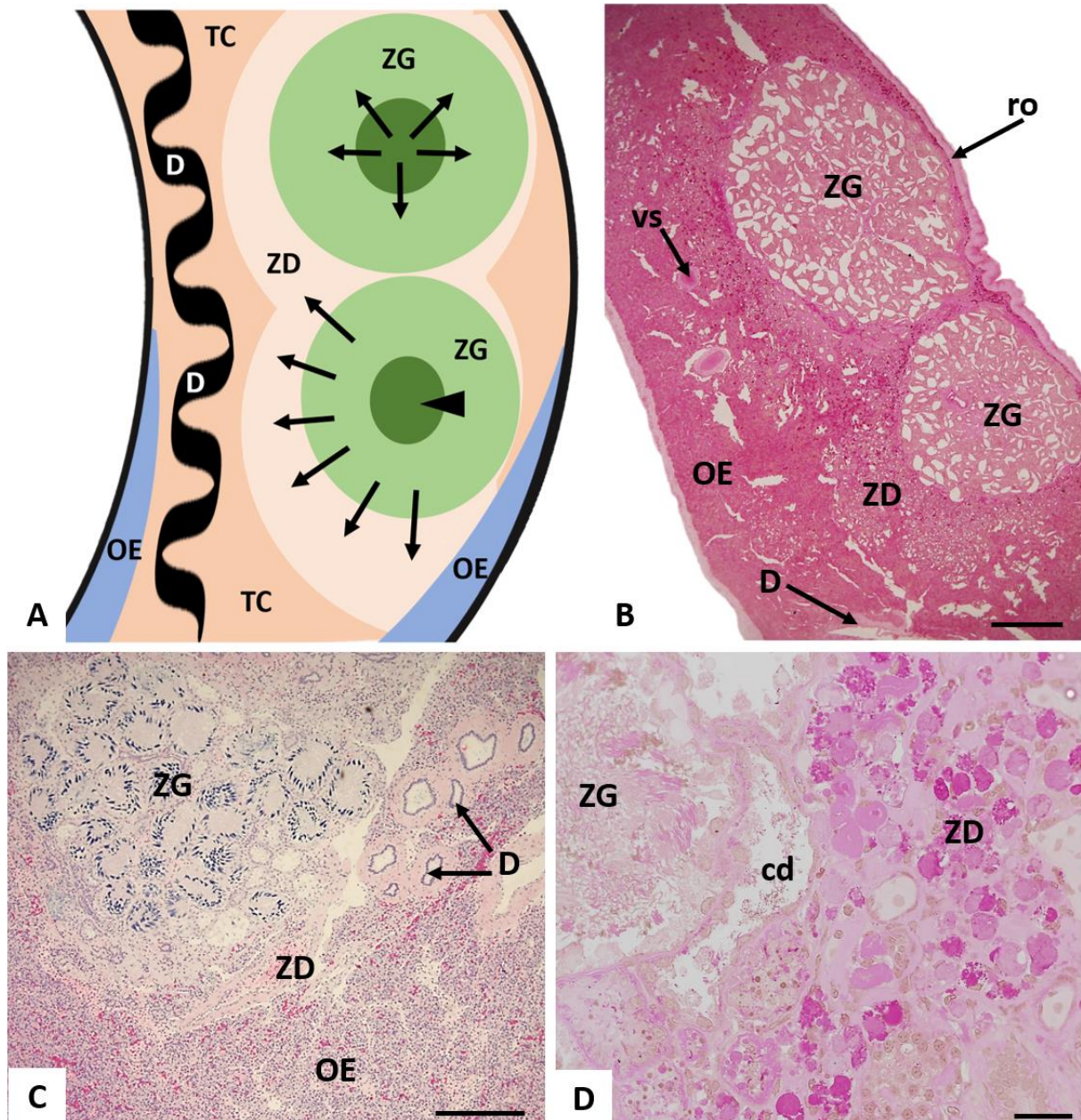
Fonte: Própria Autora

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



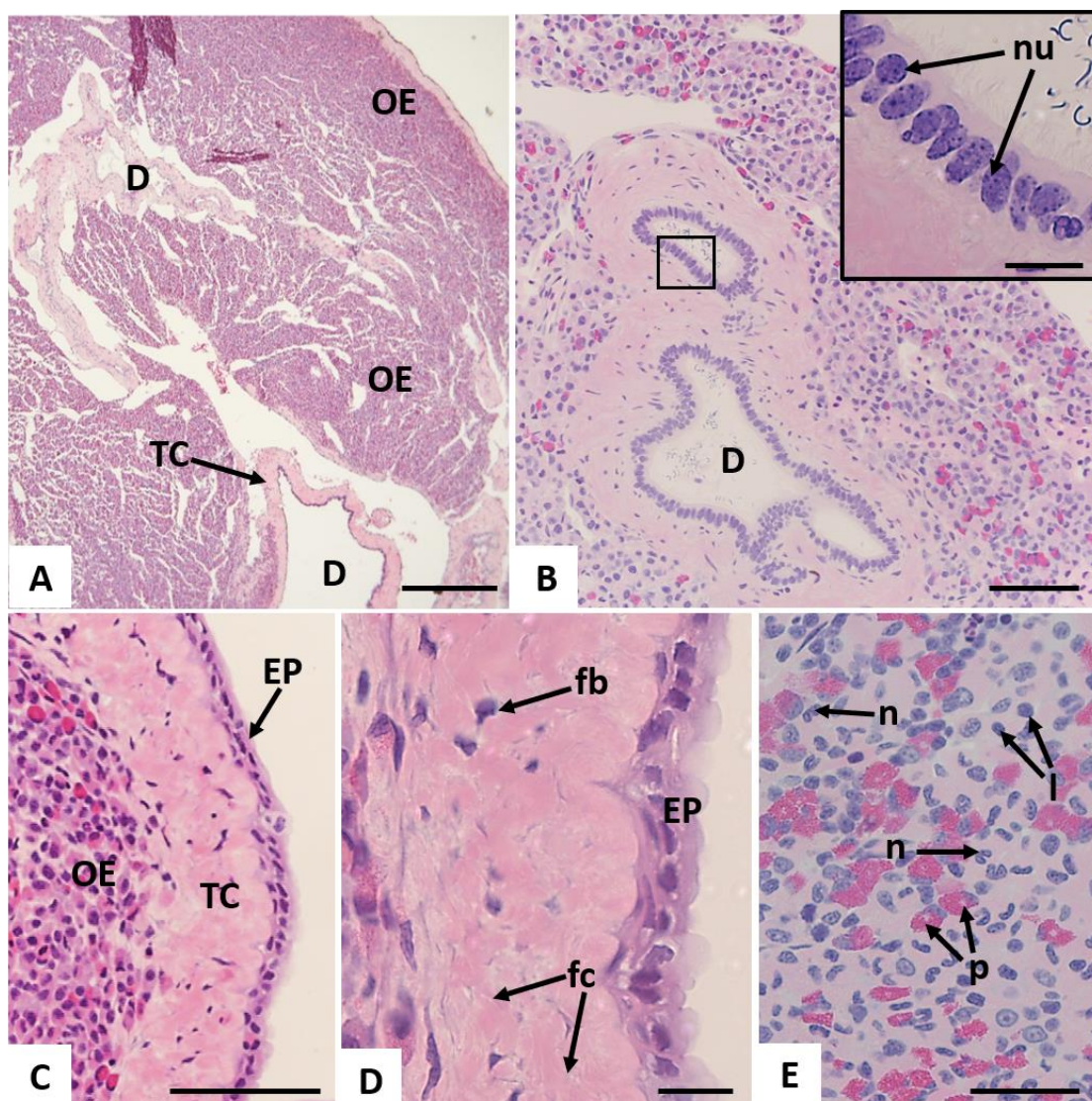
Fonte: Própria Autora.

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 envolta 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.



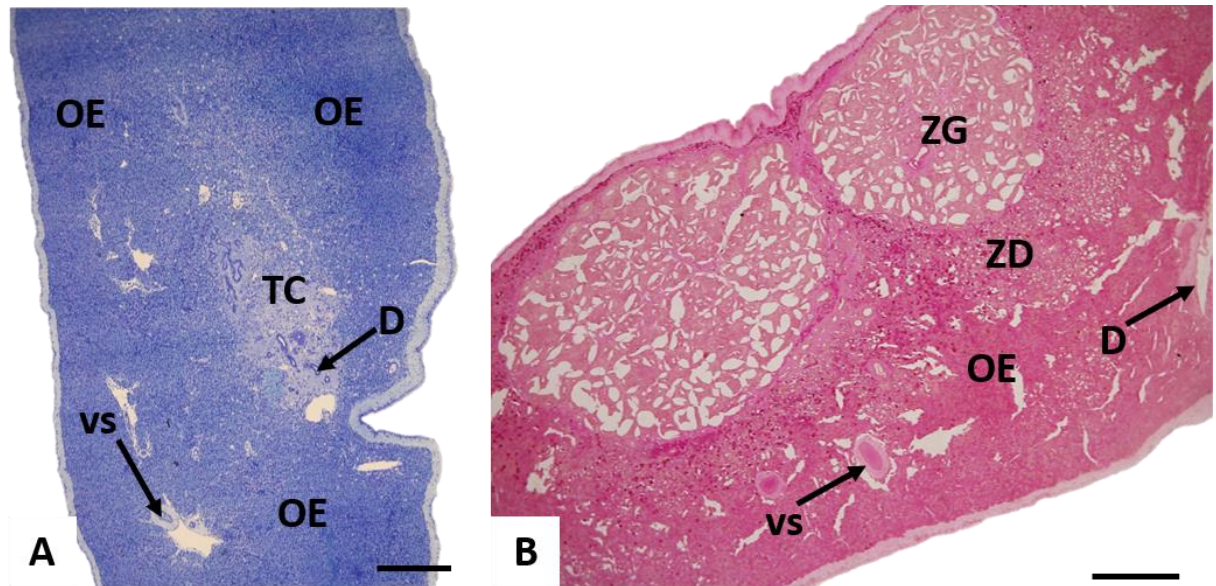
Fonte: Própria Autora

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.



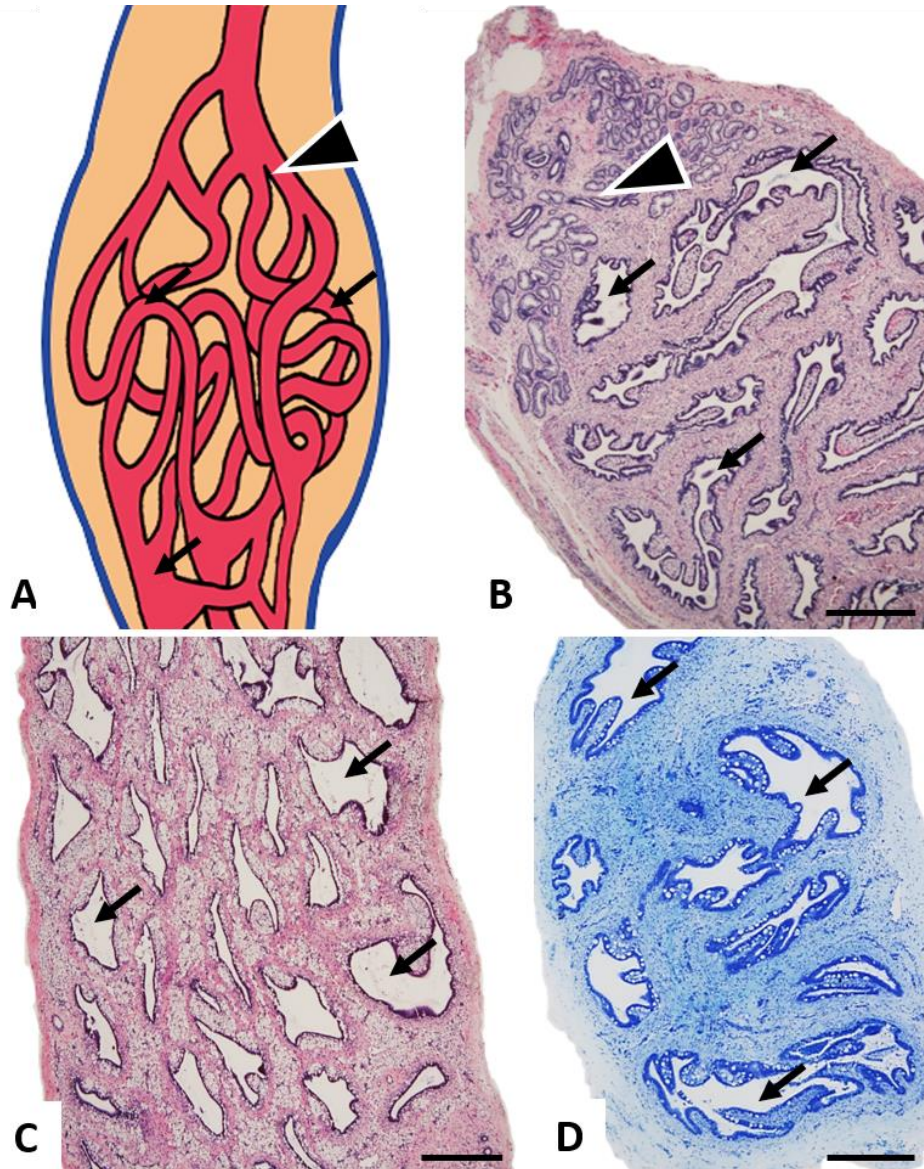
Fonte: Própria Autora

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 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.



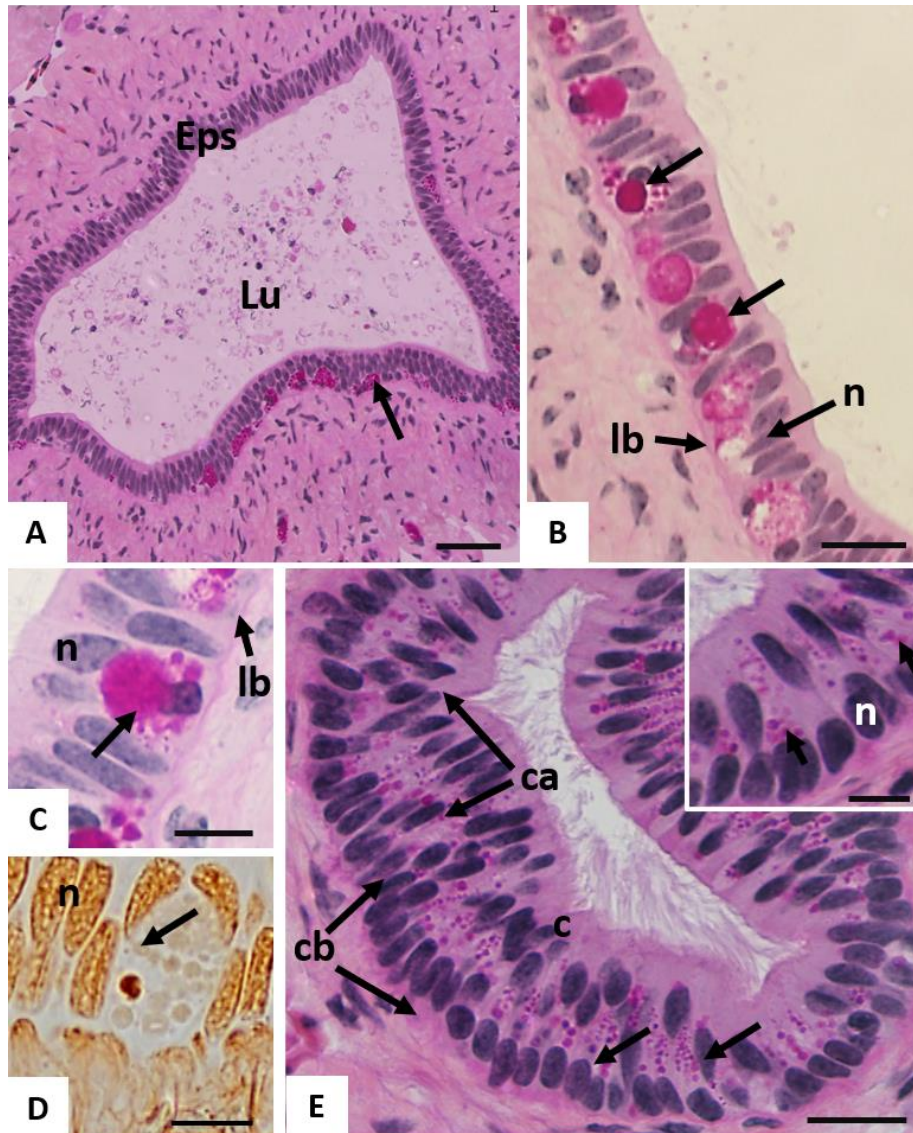
Fonte: Própria Autora

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 μ m. Coloração: Hematoxilina de Harris associada a Eosina e Azul de toluidina (pH: 7).



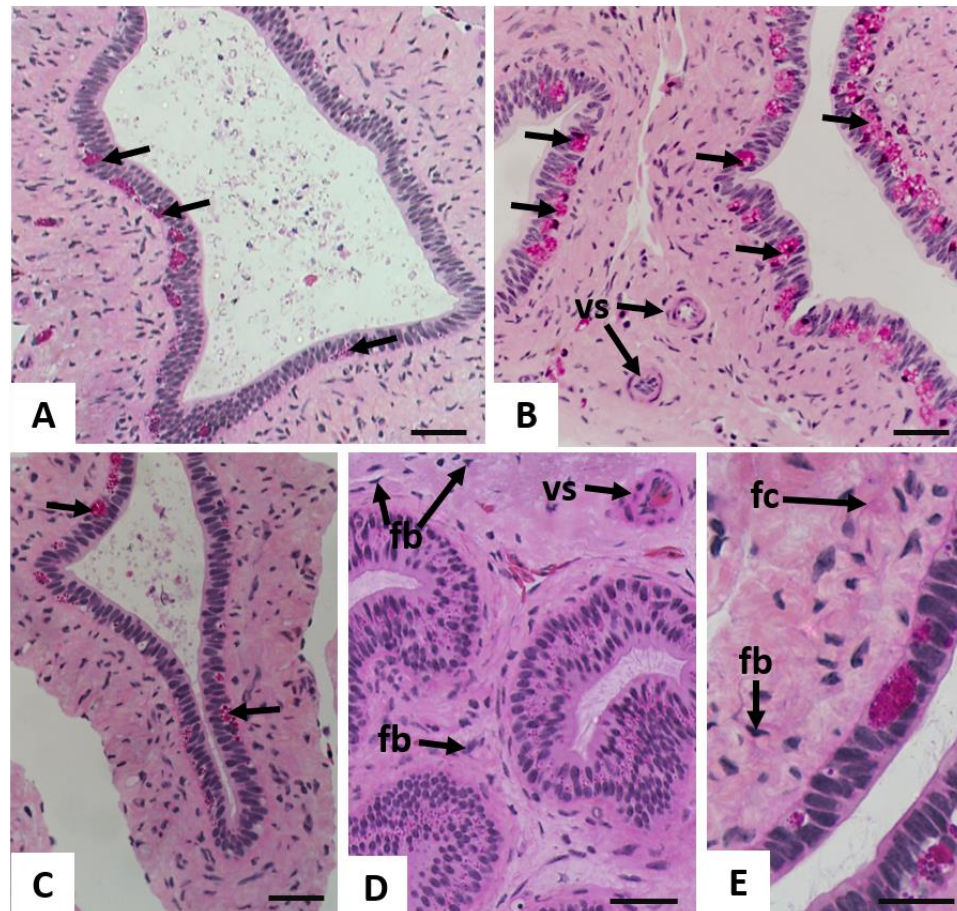
Fonte: Própria Autora

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.



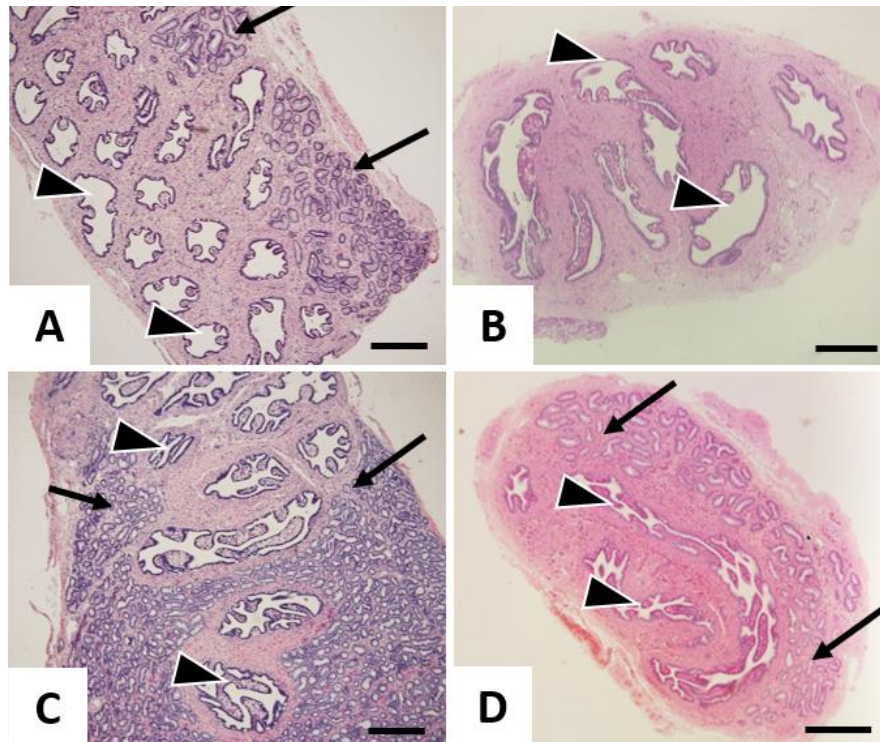
Fonte: Própria Autora

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.



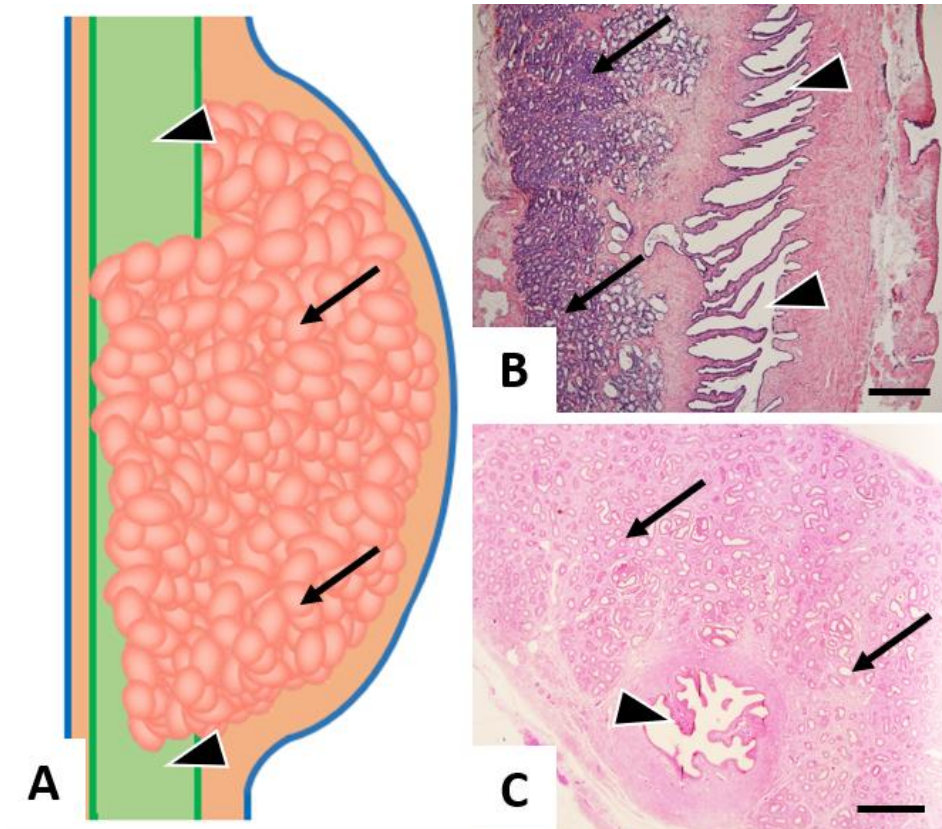
Fonte: Própria Autora

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.



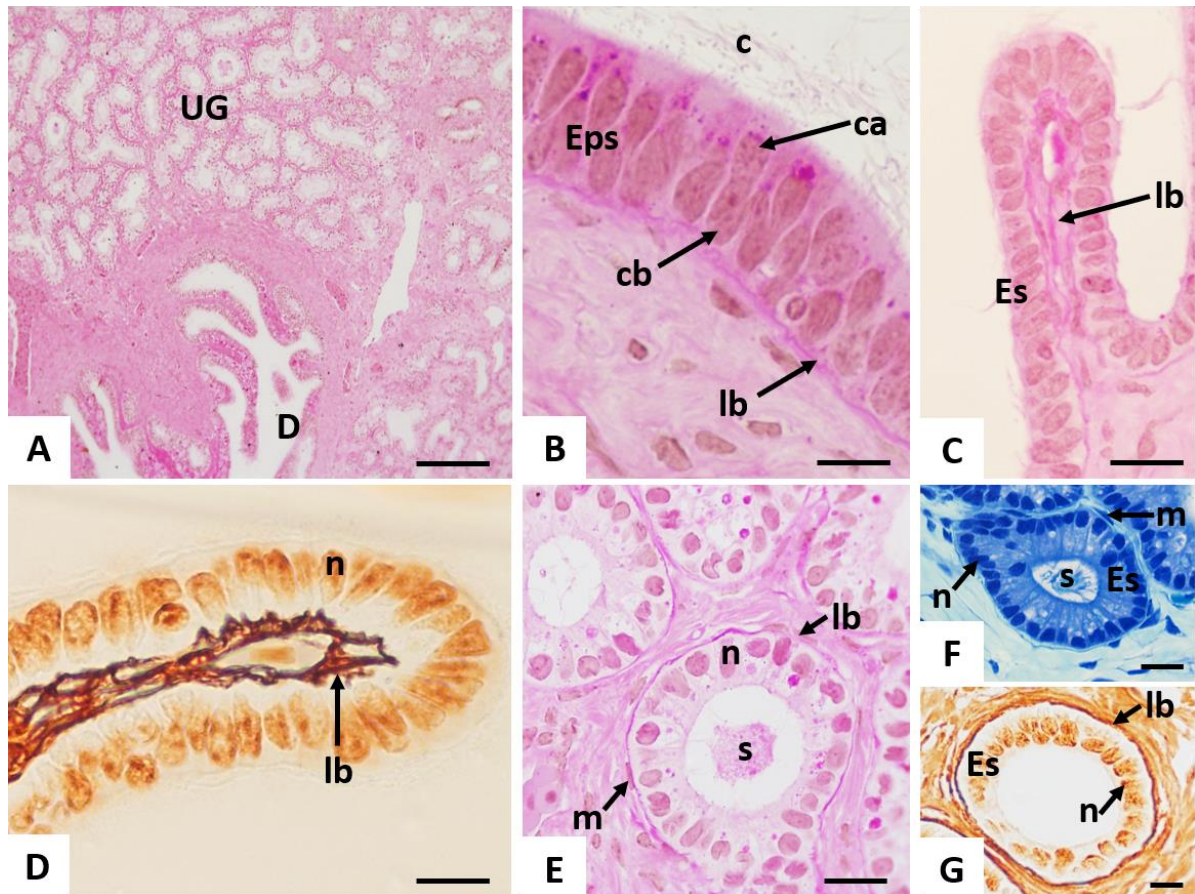
Fonte: Própria Autora

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



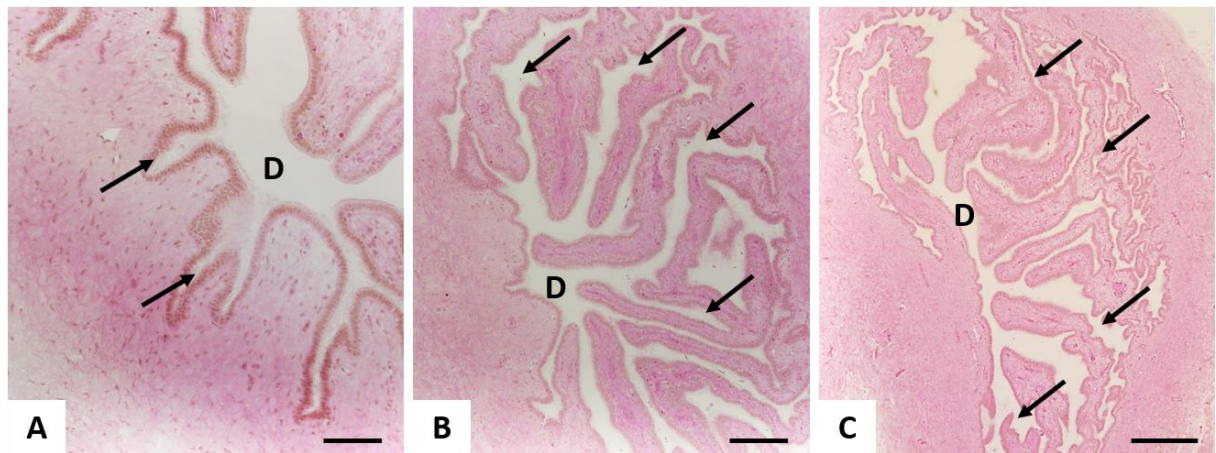
Fonte: Própria Autora

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.



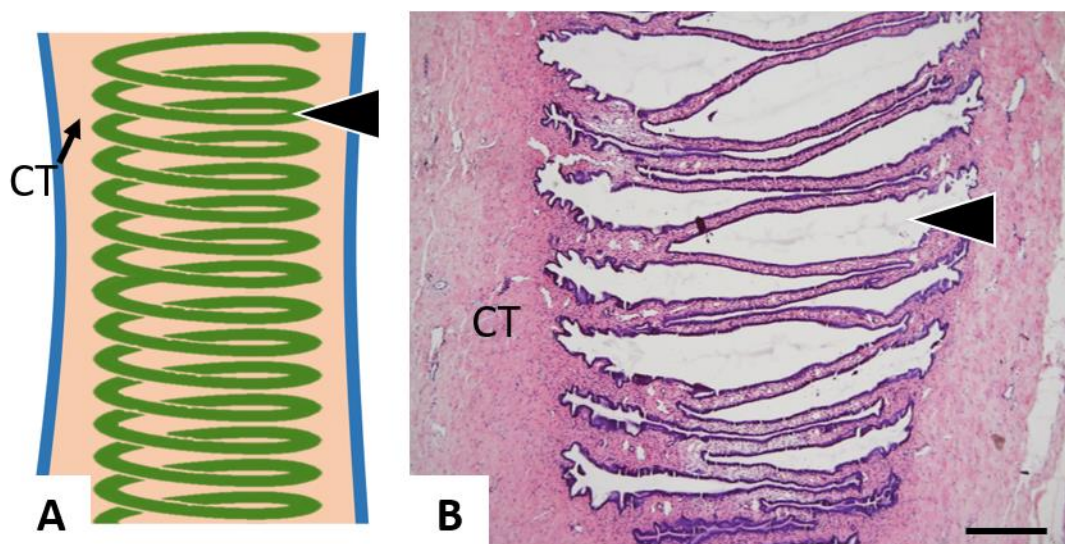
Fonte: Própria Autora

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.



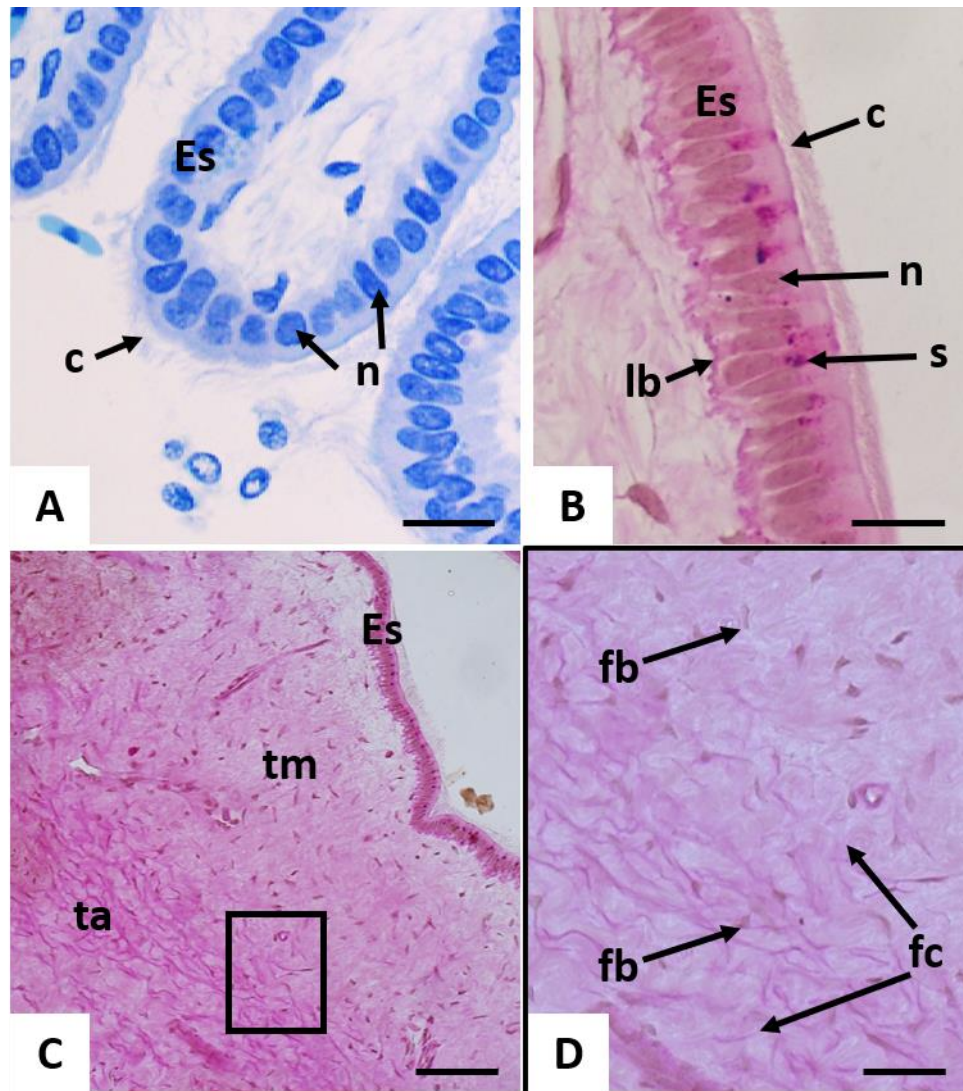
Fonte: Própria Autora

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.



Fonte: Própria Autora

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.



Fonte: Própria Autora

4. DISCUSSÃO

A espécie de raia de água doce *Potamotrygon amandae* apresenta intrínseca relação entre a morfologia do trato reprodutivo masculino com a formação, composição e armazenamento dos espermatozoides e líquido espermático.

O sistema excretor e o trato reprodutivo se apresentaram ductos completamente separados até a liberação na cloaca, o que possibilita pouco, ou nenhum contato entre sêmen e urina, já descrita para outras espécies de raias, esta característica implica em um insignificante impacto fisiológico sobre o sêmen (DZYUBA *et al.*, 2019b).

Os testículos como órgãos pares e, assim como os demais órgãos do trato, ambos funcionais, já foram reportados para diversas espécies de Chondrichthyes. Esta estrutura dos órgãos, além de espécies dulcícolas, também já foi reportada para espécies marinhas, demonstrando uma conformação conservativa, tanto em função, quanto em morfologia para peixes cartilaginosos (CHARVET-ALMEIDA, 2001; PEDREROS-SIERRA; RAMÍREZ-PINILLA, 2015; MOYA, 2017).

Porém, nem todos os órgãos apresentam os mesmos tecidos e morfologia para todas as espécies; em *Potamotrygon amandae* o epitélio do ducto variou em cada órgão, a glândula de Leydig apresenta na parte final do órgão tecido epitelial simples no ducto, assim como a vesícula seminal, que apresenta por toda a extensão do ducto tecido epitelial simples colunar; para outras espécies de água doce o ducto pode apresentar o mesmo epitélio por todos os órgãos, como exemplo, *Himantura signifer* apresentou tecido epitelial pseudoestratificado por toda a extensão do órgão (CHATCHAVALVANICH *et al.*, 2005).

O epitélio pseudoestratificado, que está presente no revestimento dos ductos no epidídimo, está, também, presente em diversos órgãos e estruturas, como traqueia, brônquios e cavidade nasal, sendo que seu papel já reportado de, além de revestimento, o de proteção, transporte, absorção e secreção de substâncias (GARTNER; HIATT, 2007) que pode ser aplicado ao ducto que realiza este mesmo encargo no transporte de sêmen.

A secreção encontrada nos ductos, de composição baseada em polissacarídeos neutros ligados a proteínas e lipídios, é uma característica já descrita do epidídimo de Chondrichthyes, onde há a presença de um epitélio especializado em secreção de proteínas (JONES; JONES, 1982). Estudos demonstraram que a maturação e estocagem de espermatozoides no epidídimo são importantes passos para ativação e qualidade espermática, estão, assim, relacionadas a função desta secreção liberada para a luz dos ductos, demonstrando a importância deste órgão

na reprodução da espécie dando início a etapa de capacitação dos espermatozoides a partir da maturação espermática epididimal (JONES *et al.*, 1984; DZYUBA *et al.*, 2018).

A capacitação e manutenção dos espermatozoides iniciada no epidídimo se mantém nos outros órgãos do trato, as secreções da glândula de Leydig, dentre outros órgãos, também desempenham importante papel na maturação dos espermatozoides (JONES *et al.*, 1984), assim como o seminal proveniente da vesícula seminal de *P. amandae* apresentou grande quantidade de proteínas (DZYUBA *et al.*, 2018). Diversas espécies apresentam, em mais de um órgão do trato, secreção de substâncias, tanto espécies marinhas quanto dulcícolas de Chondrichthyes (CHATCHAVALVANICH *et al.*, 2005; MELO, 2013; PEDREROS-SIERRA; RAMÍREZ-PINILLA, 2015; MOYA, 2017).

Apesar de a característica PAS+ se manter em todos os órgãos, exceto nos testículos, essa secreção pode variar, tanto em quantidade quanto em função. Dzyuba *et al.* (2018) demonstra que a motilidade espermática se inicia a partir da passagem pelo epidídimo e se mantém pelos outros órgãos, com diferentes composições de líquido seminal e motilidade dos espermatozoides.

A descrição dos órgãos componentes do trato reprodutivo masculino de *Potamotrygon amandae* demonstrou que o trato é complexo, de acordo com dados já relatados para outras espécies de Chondrichthyes; cada órgão apresentou morfologia e estrutura condizentes a função específica esperada para a constituição e manutenção do sêmen. O epitélio do ducto variou durante sua passagem em cada órgão do trato. Os órgãos apresentaram produção de secreções cuja composição indica a função de possibilitar a viabilidade e qualidade do sêmen na passagem pelo meio externo até a fertilização interna realizada pela espécie.

REFERÊNCIAS

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

CHARVET-ALMEIDA, P. Ocorrência, biologia e uso das raia de água doce na baía de Marajó (Pará, Brasil), com ênfase na biologia de *Plesiotrygon iwamae* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Dissertação de mestrado. Programa de Zoologia da Universidade Federal do Pará. Belém, 2001.

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.

CHATCHAVALVANICH, K.; THONGPAN, A.; NAKAI, M. Structure of the testis and genital duct of freshwater stingray, *Himantura signifer* (Elasmobranchii: Myliobatiformes: Dasyatidae). **Ichthyological Research**, v. 52, n. 2, p. 123-131, 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 Aquariculture & Aquatic Sciences**. v. 2, p. 62-90, 1995.

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, 2019a.

DZYUBA, V.; SHELTON, W. L.; KHOLODNYY, V.; BORYSHPOLETS, S.; COSSON, J.; DZYUBA, B. Fish sperm biology in relation to urogenital system structure. **Theriogenology**, n. 132, p. 153-163, 2019b.

ENGEL, K. B.; CALLARD, G. V. The Testis and Spermatogenesis. in Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes. Department of Anatomy and Cell Biology Indiana University School of Medicine Notre Dame, Indiana, USA, p. 171, 2005.

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.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Tratado de Histologia em cores. 3ª ed, Rio de Janeiro, Elsevier, 2007.

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

JONES, R. C.; JONES, N.; DJAKIEW, D. Luminal composition and maturation of spermatozoa in the male genital ducts of the Port Jackson shark, *Heterodontus portusjacksoni*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 230, n. 3, p. 417-426, 1984.

LESSA, R. P.; SANTANA, F. M.; RINCÓN, G.; GADIG, O. B. F.; EL-DEIR, A. C. A. Biodiversidade de elasmobrânquios do Brasil. In: Workshop para avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade das zonas costeira e marinha do Brasil. Ministério do Meio Ambiente (MMA), Brasília, 2002.

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.

MELO, A. B. Biologia reprodutiva das raias *Sympterygia acuta* Garman, 1877 e *S. bonapartii* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes, Rajoidei) na plataforma do sul do Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, 2013.

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. Fishes of the world. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, 1984.

NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. Fishes of the world. 5nd ed. New York: John Wiley and Sons, 2016.

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.

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.

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. 523 p. 1985.

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.

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. *histrrix*. **Zygote** v. 19, p. 245–253, 2010.

Capítulo 3 - Espermatogênese da Raia de Água doce
***Potamotrygon amandae* (Myliobatiformes, Potamotrygonidae)**

INTRODUÇÃO

A raia *Potamotrygon amandae* (Myliobatiformes, Potamotrygonidae), é exclusivamente dulcícola (NELSON; GRANDE; WILSON, 2016) e apresenta uma grande distribuição nas bacias Amazônica e Paraná-Paraguai além de países como Argentina, Bolívia e Paraguai (LOBODA *et al.*, 2016). Entretanto, recentemente, esta espécie vem sendo relatada na região do Alto Rio Paraná, com a sua colonização favorecida pelasclusas existentes nas usinas hidrelétricas instaladas ao longo do Tietê-Paraná, locais onde a espécie não fazia parte das espécies aquáticas nativas (GARRONE-NETO *et al.*, 2007; GARRONE-NETO; HADDAD JR., 2010).

Nos meses de dezembro a fevereiro no norte do país, durante a cheia no ciclo hidrológico dos corpos d'água, a espécie *P. amandae* tem o seu período reprodutivo bem definido e intrinsecamente relacionada ao ciclo hídrico (CHARVET-ALMEIDA, 2005). 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).

Em *P. amandae*, assim como nos demais Condriichthyes a fertilização é interna, as fêmeas apresentam viviparidade, que consiste no desenvolvimento dos ovos retidos na fêmea, e nascimento da prole já em estado juvenil (NELSON; GRANDE; WILSON, 2016) e os machos apresentam o cláasper, que além de ser o órgão copulador, é também um dos maiores dimorfismos dentro de espécies de raias (CARRIER; PRATT; CASTRO, 2004).

Em elasmobrânquios, processos como a espermatogênese, espermiogênese e modificações do trato reprodutivo são controlados em sua maioria por mecanismos que agem, através, dentre vários modos, de zonificação testicular (CALLARD *et al.*, 1985) e da presença de células de Sertoli (HAI *et al.*, 2014).

Os testículos são órgãos pares e desempenham duas funções distintas, espermática e hormonal, de modo que, neste órgão estão presentes dois tipos celulares principais, células germinativas e células somáticas, que atuam respectivamente na espermatogênese e hormonogênese (ENGEL; CALLARD, 2005). São considerados três estruturas distintas de testículos, considerando a sua morfologia e o caminho percorrido pelas células durante o desenvolvimento: radial, diametral e composto, que se apresentam relacionadas a diferentes grupos (PRATT JR, 1988).

O tipo composto está presente em espécies da ordem Rajiformes e Myliobatiformes, já descrito em espécies do gênero *Potamotrygon* (Myliobatoidei), e se caracteriza como uma mistura dos outros dois tipos, onde espermatozoides 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 (PEDREROS-SIERRA; RAMÍREZ-PINILLA, 2015).

Processos como a espermatogênese ocorrem na zona germinativa com uma espermatogônia e uma única célula de Sertoli formando um espermatocisto; este processo pode ser definido como a formação e desenvolvimento de células germinativa masculinas, desde espermatogônias as células iniciais, a espermatócitos, espermátides até espermatozoides, e ocorre independentemente da diferença morfológica na estrutura de testículos, onde existe um padrão de desenvolvimento comum (GRIER, 1992; YOSHIDA, ASTURIANO, 2020).

Desta forma, o objetivo deste capítulo foi caracterizar a espermatogênese da espécie através da análise de seu epitélio germinativo e as células presentes no mesmo fornecendo informações que subsidiarão estudos reprodutivos e ecológicos da espécie recentemente observada no reservatório da Usina Hidrelétrica de Jupia.

MATERIAL E METODOS

Indivíduos machos adultos de *Potamotrygon amandae* (n=10) foram coletados em novembro de 2017, com auxílio de pescadores locais e utilização de arpão no reservatório de Jupia, rio Paraná, no município de Ilha Solteira, São Paulo, Brasil (20° 25' 52" Sul, 51° 20' 17" Oeste), sob a autorização do SISBIO nº 58102-1.

Os animais coletados foram mantidos no Laboratório de Ictiologia Neotropical, LINEO, Departamento de Biologia e Zootecnia, UNESP, Ilha Solteira, SP, Brasil. Todo o procedimento foi realizado ~~sob~~ de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética e Uso Animal (CEUA-FEIS/UNESP 14/2018).

Os espécimes foram anestesiados com uma solução de MS 222. Após, os testículos 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. Os testículos foram desidratados gradualmente com álcool e então incluídos em historesina Leica. Para a confecção das lâminas histológicas, o material já incluído foi submetido a cortes de 3µm de espessura em micrótomo Zeiss RM2244, corados em Hematoxilina e Eosina, Azul de Toluidina + Bórax, pH 7, e Metanil Yellow + Hematoxilina Férrica e PAS; após, fotomicrografados em microscópio Zeiss – AXIOCAM-MRc5.

RESULTADOS

Morfologia Testicular

Em *Potamotrygon amandae* os testículos são órgão pares e cada lóbulo testicular é constituído por zonas germinativas circundadas por uma zona degenerada, que, por sua vez é envolta por um tecido conjuntivo que também envolve o ducto; no testículo também está presente o órgão epigonal.

As zonas germinativas (Fig. 1) se localizam na porção dorsal do testículo, e são compostas por cistos de células germinativas (Fig. 1, 2A-C), ela é envolta pela zona degenerada, formada por espermatocistos pós espermição (EPE) que continham células da linhagem germinativa já liberadas para os ductos; o órgão epigonal é um órgão sólido formado por tecido conjuntivo e células do tecido linfóide.

Na zona germinativa os espermatocistos estão dispostos de acordo com os estágios das células germinativas, de forma que, do centro em direção a periferia, ocorre todo o processo de espermatogênese (espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides), denominado por desenvolvimento radial (Fig. 1A-C). Ao final da espermatogênese os espermatozoides são liberados para os ductos eferentes (Fig. 2A-C), formando a zona degenerada (Fig. 1A e C, 2A e D).

Células Germinativas e Espermatogênese

As espermatogônias primárias de *P. amandae* (Fig. 3A e B) são células iniciais e as maiores da linhagem germinativa, possuem grandes núcleos que variam de redondos a ovalados, cromatina pouco condensada e com distribuição irregular, nucléolos bem marcados, citoplasma amplo e com vacúolos; elas podem ser observadas em grupos de 2 ou mais células (Fig. 3A) associadas as células de Sertoli, que apresentavam núcleos em formato de vírgula bem demarcado, também são observadas em cisto organizadas em uma camada única de células (Fig. 3B), onde pode ser observada a presença de luz espermatocística.

À medida que as espermatogônias primárias sofrem divisões mitóticas, originam cistos contendo em seu interior as espermatogônias secundárias (Fig. 3C e D). Estas células, apesar de apresentarem características muito próximas das suas antecessoras, são menores, com núcleo central e se organizam em cistos bem definidos, com mais de uma camada de células associadas as células de Sertoli e um lúmen presente (Fig. 3C). A partir deste momento, por conta da proliferação mitótica nos espermatocistos, já podem ser observados cistos com lúmen ausentes (Fig. 3D e E).

As espermatogônias secundárias se diferenciam em espermatócitos primários, que continuam a proliferação celular dentro dos cistos assim como suas antecessoras, porém, agora agrupadas em conjuntos de células germinativas acompanhadas por uma mesma célula de Sertoli localizada na periferia, estrutura chamada espermatoblasto (Fig. 3F). Os espermatócitos primários podem ser identificados pela compactação da cromatina, formando o complexo sinaptonêmico. Estes sofrem a primeira divisão meiótica originando os espermatócitos secundários.

As espermatídes (Fig. 3G), oriundas da segunda divisão meiótica dos espermatócitos, passam por processo de diferenciação. Este processo ocorre a partir da aproximação do núcleo das espermatídes em direção ao núcleo das células de Sertoli localizadas na periferia dos espermatocistos, que agora contém novamente um lúmen (Fig. 3G); a partir deste momento inicia-se o alongamento da porção anterior do núcleo das espermatídes, que inicialmente apresentam formato de gota e gradualmente se alongam; o espiralamento é iniciado na base do núcleo, assim como a formação da cauda (Fig. 3G-J).

Durante a espermiogênese e processo de espiralamento do núcleo, ocorre um agrupamento paralelo das espermatídes, de forma que as cabeças das espermatídes permanecem direcionadas para o núcleo da célula de Sertoli localizada na periferia do cisto (Fig. 3H-J).

Ao final do processo da espermiogênese, as espermatídes estão dispersas no interior dos cistos e não mais agrupadas, posteriormente ocorre a liberação dos espermatozoides para o ducto; o espermatocisto passa a ser denominado como uma ampola degenerada (Fig. 3I) e irá compor a zona degenerada.

As células de Sertoli passam por diversas modificações durante o desenvolvimento das células germinativas. O formato do núcleo se altera de triangular (Fig. 3A, B), quando justaposta as células iniciais, pavimentoso, em formato de virgula, no início do espermatoblasto formado com os espermatocistos (Fig. 3D), até o a última estrutura com as espermatídes, apresentando núcleo arredondado e muito evidente (Fig. 3G-I).

Figura 19 - Esquema da morfologia interna e sentido do desenvolvimento das células da linhagem germinativa de *Potamotrygon amandae*. As setas indicam sentido do desenvolvimento radial das células germinativas dentro da Zona Germinativa, partindo da região chamada Zona Germinativa Inicial (cabeça de seta) para a Zona Germinativa Desenvolvida (ZG), para então adentrar a Zona Degenerada (ZD). D- Ducto. OE – Órgão Epigonal. TC – Tecido Conjuntivo.

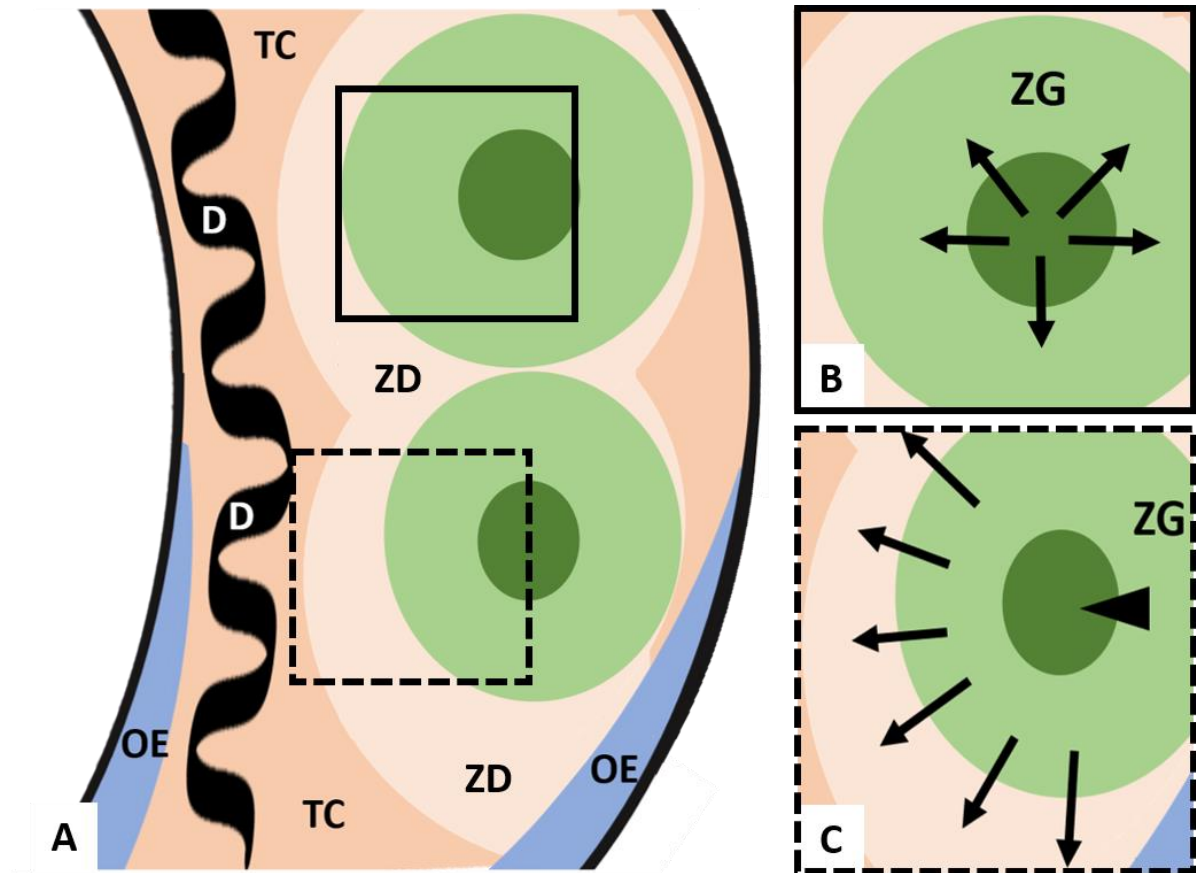


Figura 20 - Estrutura interna do desenvolvimento de células germinativas de *Potamotrygon amandae*. A – Delimitação de Zonas: Germinativa Inicial (ZGI), Germinativa Desenvolvida (ZGD) e Degenerada (ZD). B – Espermatocistos no início de desenvolvimento (eci) presentes na zona germinativa inicial. C – Espermatocistos em desenvolvimento avançado (ecd) presentes na zona germinativa desenvolvida. D – Ampolas degeneradas (ad) que já abrigaram espermátides e já liberaram para a luz dos ductos, e estão presentes na zona degenerada (ZD). Colorações: Azul de toluidina, pH 7,0. Escalas - A: 50µm, B-D: 20µm.

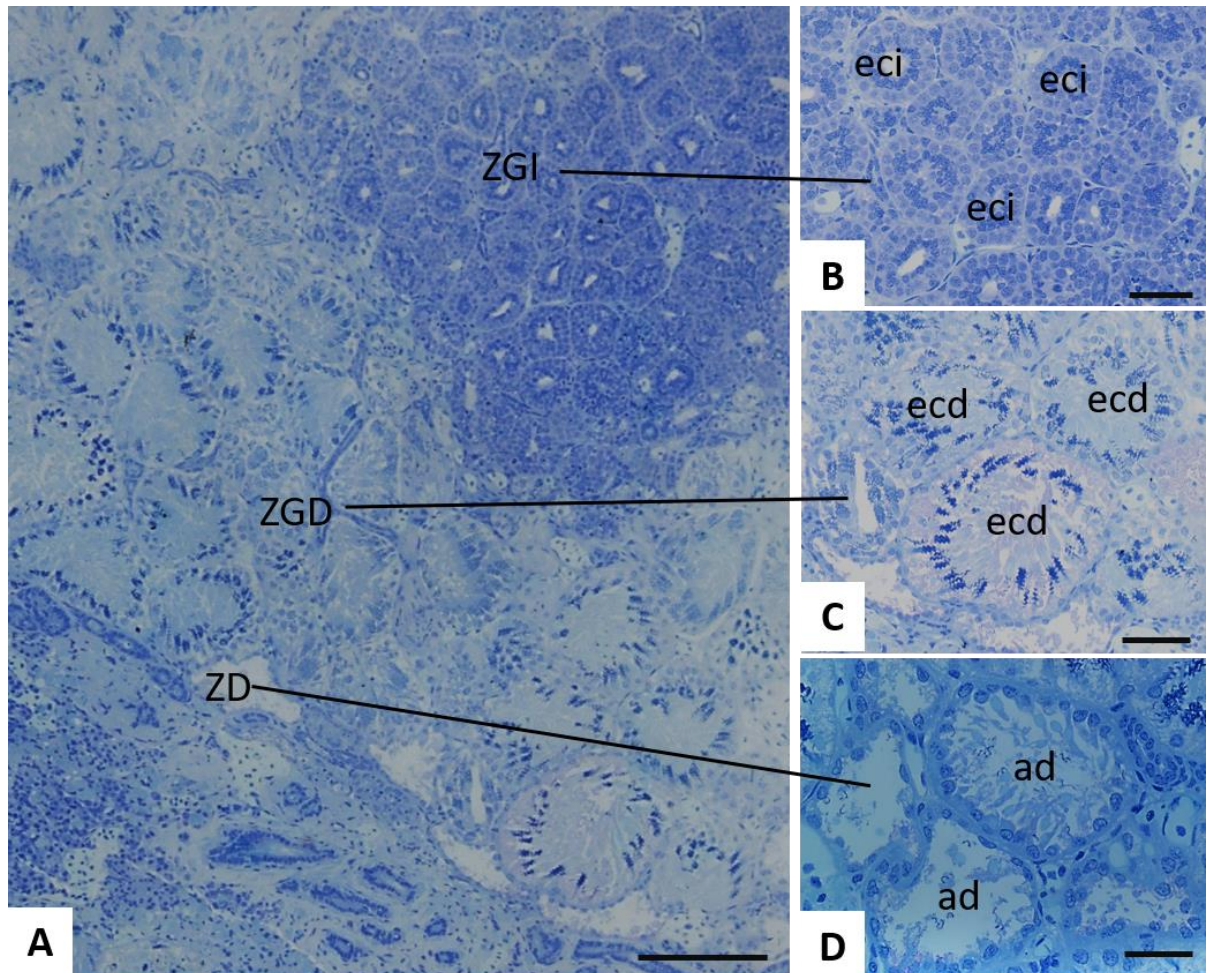
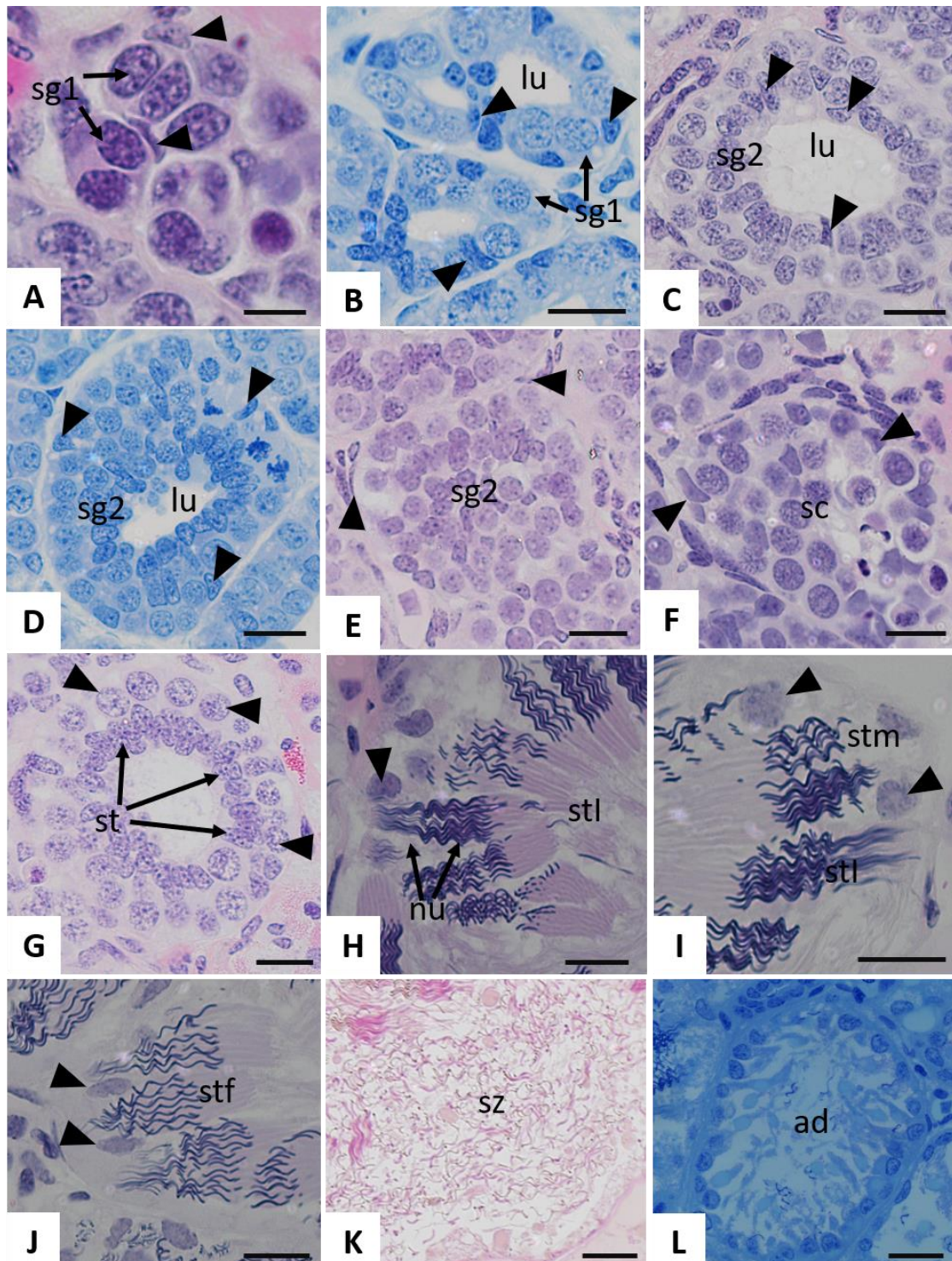


Figura 21 - Espermatogênese de *Potamotrygon amandae*. A – Espermagônias primárias (sg1), grupos de 2-3 células ligadas as células de Sertoli (cabeça de seta). B - Espermagônias primárias em cisto de camada única. C – Espermatogônias secundárias (sg2) em cisto de várias camadas, células de Sertoli em meio as camadas do cisto. D - Espermatogônias secundárias em cisto de várias camadas, células de Sertoli já migradas para a periferia. E – Espermatocisto de espermatogônias secundárias sem a presença do lúmen (lu). F - Espermatocisto de espermatócitos (sc). G –Espermátides (st) de núcleo ovalado em direção ao núcleo das células de Sertoli. H – Espermátides em início de espiralamento (stl) do núcleo (nu). I - Espermátides em espiralamento intermediário (stm) e inicial. J - Espermatocisto de espermátides em espiralamento final (stf). K - Espermatocisto de espermatozoides (sz). L – Ampola degenerada (ad). Colorações: A, C, E- J: Hematoxilina e Eosina; B, C, K e L: Azul de Toluidina, pH 7,0; K: PAS. Escalas – A: 5µm; B-L: 10µm.



DISCUSSÃO

O desenvolvimento das células da linhagem germinativa dentro de um conjunto de inúmeras unidades funcionais, os espermatocistos é uma característica bem demarcada e descrita anteriormente para espécies de Chondrichthyes (PRATT JR, 1988; GRIER, 1992).

O testículo poliespermatocístico se desenvolve em zonas em *P. amandae*, onde ocorre o desenvolvimento germinativo do centro em direção a periferia, sentido radial dentro das zonas germinativas e diametral quando fora, compondo o tipo composto, já descrito para espécies de Chondrichthyes (GRIER, 1992), incluindo raias dulcícolas, como *P. magdalenae* (PEDREROS-SIERRA; RAMIREZ-PINILLA, 2015).

O desenvolvimento das células germinativas, assim como suas características, e a ordem com que estes processos ocorrem dentro da espermatogênese varia entre espécies e grupos, e é um importante fator par ao conhecimento da reprodução das espécies. A observação de indivíduos imaturos com células primordiais se formando no tecido conjuntivo envolto em órgão epigonal, que preenche quase todo o órgão é uma característica das chamadas raias cururus, nome popular regional aplicado a espécies como *Potamotrygon* cf. *histris*, espécie amazônica que apresenta essa mesma estrutura durante o processo de formação das células germinativas (ZAIDEN *et al.*, 2010).

Grupos mais distantes dentro de raias, como a raia marinha *D. guttata*, assim como *P. amandae*, desenvolvem a maturação das células germinativas dentro de cistos, aumentam a área germinativa e sofrem diminuição do órgão epigonal no testículo de acordo com a maturação sexual do indivíduo e a proliferação celular (ACERO *et al.*, 2008).

Com a proliferação celular, ocorre a formação de outras estruturas dentro da zonas germinativas, e a formação do espermatoblasto é característica já observada para outras espécies, e em *P. amandae*, esta estrutura, além de se formar, também sofreu modificações durante a espermatogênese e espermiogênese; desde sua primeira formação, um conjunto de Células de Sertoli e espermatócitos, até sua conformação com espermátides que apresentam os núcleos alojados dentro do citoplasma das células de Sertoli; ambas as estruturas e localizações distintas de células germinativas em relação à célula de somática de Sertoli já foram registradas para Chondrichthyes (ZAIDEN *et al.*, 2010; PEDREROS-SIERRA; RAMIREZ-PINILLA, 2015).

As células de Sertoli detém importante papel na reprodução das espécies através da coordenação e controle do desenvolvimento das células germinativas em um chamado microambiente testicular (HAI *et al.*, 2014), e devido a sua interação e relação intrínseca com

o desenvolvimento de gametas, essas células estão presentes em conformações e estruturas testiculares, incluindo, como grupos de células iniciais, como espermatogônias isoladas ligadas a uma única célula de Sertoli, conformação já descrita anteriormente (PRATT, 1988, POULAKIS; GRIER, 2014), além de conformações já em espermatocistos, como a formação de uma única camada em formato de anel proveniente da sua associação com espermatogônias (CHATCHAVALVANICH; THONGPAN; NAKAI, 2005).

Em *P. amandae* esta célula somática está presente no órgão, e apresentou grande variação de tamanho e formato, tanto de núcleo como de citoplasma, acompanhando o caminhar da formação dos gametas, assim como em *Potamotrygon* cf. *histris*, onde foi demonstrada diferença significativa do comprimento, área e largura das células de Sertoli em relação ao estágio das células germinativas a que esta célula somática estava associada (ZAIDEN *et al.*, 2010); observou-se que a maior área deste tipo celular foi associada a sua ligação as espermatídes e espermatozoides, esta característica também pode ser observada em *P. amandae*.

Tais modificações podem também estar relacionadas aos incrementos de hormonais que ocorrem durante o ciclo reprodutivo e apresentam uma correspondência com ao aumento de massa testicular, além de uma proliferação de espermatocistos e proliferação de células somáticas de Sertoli conectadas a produção de esteroides (MORALES-GAMBA, 2018), mais fatores associados a função destas células somáticas na coordenação e controle do desenvolvimento das células germinativas.

Com o caminhar da proliferação celular coordenada pelas células de Sertoli, as espermatídes passam agora por processos de diferenciação que, assim como *P. wallacei* culminarão no formato final do espermatozoide, é descrito como helicoidal (MORALES-GAMBA *et al.*, 2019) e passa pelo processo de formação e gradativo espiralamento da cauda, e alongamento do núcleo, que podem ser observados nos indivíduos durante a diferenciação sofrida pelas espermatídes na espermiogênese (CHATCHAVALVANICH; THONGPAN; NAKAI, 2005; ZAIDEN *et al.*, 2010; MORALES-GAMBA *et al.*, 2019).

As informações presentes neste estudo acerca da reprodução desta espécie servirão como subsídio para estudos sobre a reprodução e, baseado na morfologia das espermatídes e espermatozoides, na filogenia deste grupo de peixes dulcícolas pertencentes aos Chondrichthyes.

REFERÊNCIAS

- ACERO, P.; GRIJALBA-BENDECK, M.; MORENO, F.; ACEVEDO, K.; GONZÁLEZ, E. Histología comparada del sistema reproductivo de cuatro especies de rayas caribeñas (Chondrichthyes: Batoidea). **Rev. Acad. Colomb. Cienc.** v. 32, n. 12, p. 581-596, 2008.
- CALLARD, G.V.; PUDNEY, J.A.; MAK, P.; CANICK, J.A. Stage-dependent changes in steroidogenic enzymes and estrogen receptors during spermatogenesis in the testis of the dogfish, *Squalus acanthias*. **Endocrinology**, v.117, p. 1328–1335, 1985.
- 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.
- CHATCHAVALVANICH, K.; THONGPAN, A.; NAKAI, M. Structure of the testis and genital duct of freshwater stingray, *Himantura signifer* (Elasmobranchii: Myliobatiformes: Dasyatidae). **Ichthyological Research**, v. 52, n. 2, p. 123-131, 2005.
- 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.
- 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., HADDAD JR, V. Arraías 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.
- GRIER, H. J. Chordate testis: the extracellular matrix hypothesis. **J Exp Zool**, v. 261, p. 151–160, 1992.
- HAI, Y.; HOU, J.; LIU, Y.; LIU, Y.; YANG, H.; LI, Z.; HE, Z. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, p. 66-75, 2014.
- LOBODA, T. S.; SILVA, J. P. C. B.; FONTENELLE, J. P.; CARVALHO, M. R. Catálogo de espécies: *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.
- MORALES-GAMBA, R. D. Perfil plasmático dos hormônios esteroides e morfologia das gônadas em machos e fêmeas adultas da Arraia Cururu *Potamotrygon wallacei* (Chondrichthyes-Potamotrygonidae) no período de enchente do médio Rio Negro. Dissertação de Mestrado, Programa de Pósgraduação em Aquicultura, Manaus, Amazonas, 2018.
- NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, 2016.

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.

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

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.

YOSHIDA, M.; ASTURIANO, J. F. (Ed.). Reproduction in aquatic animals: from basic biology to aquaculture technology. Springer Nature, 2020.

ZAIDEN, S. F., BRINN, R. P., MARCON, J. L., & URBINATI, E. C. Testicular structure and spermatogenesis of Amazonian freshwater cururu stingray *Potamotrygon* cf. *histrrix*. **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.