

**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO**  
**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO**  
**AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS**  
**INSTITUTO DE PESCA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA**

**ANDROLOGIA DA RAIA-VIOLA-DE-FOCINHO-CURTO *Zapteryx brevirostris* (MÜLLER & HENLE, 1841) (CHONDRICHTHYES, RHINOPRISTIFORMES)**

**Laura de Oliveira Camilo**

**Orientador: Prof. Dr. Eduardo Gomes Sanches**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

**São Paulo**

**Fevereiro – 2023**

**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO**  
**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO**  
**AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS**  
**INSTITUTO DE PESCA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA**

**ANDROLOGIA DA RAIA-VIOLA-DE-FOCINHO-CURTO *Zapteryx brevirostris* (MÜLLER & HENLE, 1841) (CHONDRICHTHYES, RHINOPRISTIFORMES)**

**Laura de Oliveira Camilo**

**Orientador: Prof. Dr. Eduardo Gomes Sanches**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

**São Paulo**

**Fevereiro – 2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

**C19a** Camilo, Laura de Oliveira.  
Andrologia da Raia-Viola-de-Focinho-Curto *Zapteryx Brevirostris* (Müller & Henle, 1841)  
(CHONDRICHTHYES, RHINOPRISTIFORMES) / Laura de Oliveira Camilo – São Paulo, 2023.  
v; 45f.; 1t., 12f.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e  
Abastecimento.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Gomes Sanches.

1. Conservação. 2. Elasmobrânquios. 3. Espermatozoide. 4. Reprodução. 5. Sêmen. 6.  
Spermatozeugmata.

I. Sanches, Eduardo Gomes. II. Título.

CDD 571.8

Permitida a cópia parcial, desde que citada a fonte – O autor

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
**INSTITUTO DE PESCA**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

"ANDROLOGIA DA RAIA-VIOLA-DO-FOCINHO-CURTO *Zapteryx  
brevirostris* (Müller & Henle, 1841) (CHONDRICHTHYES,  
RHINOBATIDAE)"

**AUTOR:** Laura de Oliveira Camilo

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Eduardo Gomes Sanches

Aprovada como parte das exigências para obtenção do título de  
MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em  
Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



---

Prof. Dr. Eduardo Gomes Sanches



---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Malavasi Bruno



---

Profª. Drª. Silvia Edelweiss Crusco

Data da realização: 16 de fevereiro de 2023



---

Presidente da Comissão Examinadora  
Prof. Dr. Eduardo Gomes Sanches

## AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado é um “filho” que tem padrinhos de várias espécies...

... Começando por *Homo sapiens*, agradeço minha família por seguirem me apoiando e “aplaudindo de pé” mesmo que a quilômetros de distância ou lá do céu (não é mesmo, vovó Nadir e Oneida?!). Em especial à minha mãe Maria José, meu pai Aristides, minha irmã Camila e minha afilhada Madalena por todo o esforço despendido para que eu chegasse até aqui, por todo abraço apertado diante dos obstáculos e principalmente por serem, no dicionário da minha vida, o significado da palavra amor.

... Aos meus amigos, que são prova de que as ligações afetivas não são dependentes das ligações biológicas.

... À veterinária Dra. Paula Baldassin, por sempre me acompanhar e apoiar desde que comecei minha história profissional com animais marinhos.

... À equipe e diretoria do Aquário de Ubatuba por todo o suporte técnico e logístico para a realização desse estudo.

... Ao Instituto de Pesca e seus profissionais por me permitirem fazer parte da história da instituição. Aqui destaco meu agradecimento especial ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Gomes Sanches, pela leveza e eficiência com que soube compartilhar comigo suas experiências profissionais e acadêmicas.

... Aos membros da banca de qualificação e defesa do mestrado, professores Dra. Silvia Crusco e Dr. Eduardo Malavasi, pelos conselhos, sugestões e interesse em doar um tempo, em meio as suas agendas compromissadas, para contribuir com esse projeto.

Seguindo o caminho da taxonomia, fica aqui o agradecimento a vários outros nomes científicos, não humanos, que, ao longo da minha caminhada profissional, tive o prazer de manejar e cuidar. Em especial à espécie *Zapteryz brevirostris* por ser a grande protagonista desse trabalho.

E, por fim, agradeço à ciência e ao ser superior (independente dos vários nomes que ele receba).

## SUMÁRIO

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
OBJETIVO GERAL .....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL .....	15
ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO .....	19
Introdução .....	23
Material e Métodos.....	24
Resultados .....	27
Discussão .....	34
Agradecimentos .....	39
Referências .....	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	44

## RESUMO

O estudo andrológico de uma espécie compreende desde a análise macro e microscópica dos órgãos reprodutivos internos até a avaliação dos parâmetros seminais e características ultraestruturais do espermatozoide. Assim como em outros vertebrados, o trato reprodutor do macho em condrictes é composto de testículos e ductos reprodutivos (ducto eferente, epidídimo, glândula de Leydig, ducto deferente e vesícula seminal). Neste estudo foram utilizados três espécimes adultos de *Zapteryx brevirostris* oriundos de captura na natureza e mantidos no Aquário de Ubatuba, Brasil. A coleta de sêmen dos exemplares foi realizada via massagem abdominal, sobre a localização anatômica da vesícula seminal, sendo precedida por avaliação ultrassonográfica. O sêmen coletado foi diluído a 1:200 e submetido a análise quantitativa e morfológica. A análise ultraestrutural foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. Foi observada correlação entre coleta bem sucedida e imagem ultrassonográfica de vesícula seminal ingurgitada, assim como de testículos com margens facilmente delimitáveis e maior ecogenicidade. Foi possível identificar espermatozoides livres com aparência filiforme helicoidal, assim como spermatozeugmatas. A concentração média dos espermatozoides resultou em 5 milhões de pacotes por ml e 140 milhões de espermatozoides por ml. O núcleo do espermatozoide apresentou formato de cone, bainha de paracromatina menos densa que a cromatina do núcleo, suave depressão da fossa nuclear, axonema abaxial 9+2 e colunas axonemais acessórias na posição 3 e 8 e de formato ovalado, com superfície interior achatada em corte transversal. Esses resultados ampliam o conhecimento sobre a andrologia dessa espécie, contribuindo para programas de reprodução *ex situ*.

**Palavras-chave:** Conservação; Elasmobrânquios; Espermatozoide; Reprodução; Sêmen; Spermatozeugmata.

## ABSTRACT

The andrological study of a species comprises from the macro- and microscopic analysis of the internal reproductive organs to the evaluation of seminal parameters and ultrastructural characteristics of the spermatozoa. As in other vertebrates, the male reproductive tract in chondrichthyans is composed of testes and reproductive ducts (efferent duct, epididymis, Leydig's gland, ductus deferens and seminal vesicle). In this study we used three adult specimens of *Zapteryx brevirostris* from wild capture and kept at the Ubatuba Aquarium, Brazil. Semen collection was performed by abdominal massage, over the location of the seminal vesicle, preceded by ultrasonographic evaluation. The semen collected was diluted 1:200 and submitted to quantitative and morphological analysis. Ultrastructural analysis was performed by transmission and scanning electron microscopy. Correlation was observed between successful collection and ultrasonographic image of an engorged seminal vesicle, as well as testicles with easily delimitable margins and higher echogenicity. It was possible to identify free spermatozoa with helical filiform appearance, as well as spermatozeugmata. The average sperm concentration resulted in 5 million packets per ml and 140 million spermatozoa per ml. The sperm nucleus showed cone shape, parachromatin sheath less dense than the chromatin of the nucleus, smooth depression of the nuclear fossa, abaxial axoneme 9+2 and accessory axonemal columns in position 3 and 8 and oval shaped, with flattened inner surface in cross section. These results broaden the knowledge about the andrology of this species, contributing to ex situ breeding programs.

**Keywords:** Conservation; Elasmobranchs; Spermatozoa; Reproduction; Semen; Spermatozeugmata.

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1- Biologia e Conservação da *Zapteryx brevirostris*

Os tubarões pertencem à superordem Selachimorpha e as raias compõem a superordem Batoidea. Ambos integram a subclasse dos elasmobrânquios e estão entre os vertebrados de maior sucesso evolutivo, com espécies distribuídas em águas tropicais, subtropicais, temperadas e frias; habitando regiões costeiras e oceânicas; sendo associadas aos ambientes pelágicos, demersais, recifais e águas continentais (Compagno, 2001).

A *Zapteryx brevirostris*, conhecida popularmente como raia-viola-de-focinho-curto ou raia-viola-de-cara-curta, é uma espécie de raia marinha, da ordem Rhinopristiformes e da família Trygonorhinidae, que apresenta como caracteres distintivos: (1) coloração dorsal castanha e ventral esbranquiçada, exceto na borda posterior das nadadeiras peitorais, local em que é possível observar mancha escura e irregular; (2) coloração alaranjada na parte ventral do rosto de machos adultos; (3) uma fileira bem destacada de tubérculos medianos, além de tubérculos esparsamente distribuídos em forma de cones na superfície dorsal e na região escapular; (3) nadadeiras dorsais com margens posteriores maiores que suas bases de implantação (Gomes, 2019).

A raia-viola-de-focinho-curto ocorre na plataforma continental do Atlântico Sul ocidental, desde o Rio de Janeiro até a Argentina. Apresenta hábito demersal, sendo encontrada usualmente em fundos arenosos ou lamosos (até 60m de profundidade), alimentando-se principalmente de pequenos peixes, crustáceos e pequenos invertebrados (Gomes, 2019).

Apesar de não ser alvo principal da pesca artesanal e industrial, espécimes de *Z. brevirostris* são frequentemente capturados como fauna acompanhante nas pescarias realizadas pelas frotas de arrasto (simples, duplo e parcelhas) e redes de emalhe (Martins & Schwingel, 2003) na costa do Brasil. Ademais, a raia-viola-de-focinho-curto apresenta características de espécies com tendência *k-estrategistas*, como crescimento lento e reprodução tardia, aumentando a suscetibilidade de sobre-exploração.

A raia-viola-de-focinho-curto encontra-se descrita na lista nacional de espécies ameaçadas (Portaria MMA nº 148, de 07 de junho de 2022) e recebe o *status* de “ameaçada” no livro vermelho da IUCN (*International Union for the Conservation of Nature*, 2019).

## 2- Modos de Reprodução em Elasmobrânquios

O sucesso evolutivo dos elasmobrânquios deve-se em grande parte as suas adaptações reprodutivas, sendo as mais significativas: (1) a fertilização interna e (2) a produção de um pequeno número de filhotes relativamente grandes, que eclodem ou nascem como tubarões ou raias em miniatura (totalmente formados e ativos), aumentando sua chance de sobrevivência, assim como a gama de presas em potencial (Carrier *et al.*, 2004; Castro, 1983; Musick & Ellis, 2005).

Os modos reprodutivos adotados pelas espécies de elasmobrânquios podem ser divididos em duas grandes categorias com base na nutrição fetal: (1) lecitotrofia, na qual todo o desenvolvimento do embrião é sustentado apenas pelo vitelo e (2) matrotrofia, condição na qual os embriões suprem-se, em parte ou totalmente, de nutrientes existentes no corpo das fêmeas, que são uma fonte adicional ou preponderante de energia para o desenvolvimento embrionário. Ademais, dependendo de quanto tempo as fêmeas retêm os ovos fertilizados, os elasmobrânquios podem ser divididos em dois grupos: formas ovíparas e vivíparas. Os elasmobrânquios ovíparos retêm seus ovos por curtos períodos de tempo e, depois, os depositam no substrato ou os fixam nas estruturas do fundo. As formas vivíparas retêm seus embriões até que os mesmos tenham concluído o seu desenvolvimento (Carrier *et al.*, 2004; Musick & Ellis, 2005). A raia-viola-de-focinho-curto é categorizada como vivípara lecitotrófica. As informações sobre os modos de reprodução em elasmobrânquios foram resumidamente apresentadas na tabela 1.

### 2.1- Oviparidade

A oviparidade é um modo de reprodução lecitotrófico que pode ser dividido em dois tipos: (1) retida, na qual a cápsula ovígera é mantida no útero durante a maior parte da gestação, sendo expelida poucas semanas antes do embrião estar completamente desenvolvido e (2) estendida, na qual as cápsulas ovígeras são depositadas, pouco depois da fecundação, no meio externo (maioria das espécies ovíparas) (Carrier *et al.*, 2004; Musick & Ellis, 2005).

## 2.2- Viviparidade Lecitotrófica ou Viviparidade do Saco Vitelino

Essa forma de reprodução lecitotrófica é a mais difundida entre os elasmobrânquios e envolve a retenção de oócitos fertilizados durante todo o desenvolvimento dentro do útero, sem aporte nutricional materno adicional além da reserva de vitelo do saco vitelínico (Carrier *et al.*, 2004; Musick & Ellis, 2005).

## 2.3- Histotrofia

Nas espécies histotróficas, a nutrição embrionária é realizada por meio da elaboração de uma substância nutritiva, nomeada "histotrofo", por estruturas especializadas do epitélio uterino, denominadas "trofonemas".

A secreção uterina na forma de "histotrofia lipídica" é encontrada apenas em certos batóides e deve ser diferenciada da "histotrofia limitada" (também conhecida como histotrofia mucóide, incipiente ou mínima). A histotrofia lipídica é de fácil identificação em raias prenhes devido à presença de um trofonemata produtor de lipídios e significativas quantidades de secreções brancas e leitosas ("leite uterino") encontradas no útero durante o desenvolvimento embrionário (Musick & Ellis, 2005). A histotrofia limitada, por sua vez, é mais difícil de ser identificar através de observações de campo, pois envolve a secreção de uma substância muito mais diluída (por exemplo muco) do que a encontrada no histotrofo lipídico, além de poder ocorrer apenas episodicamente durante a gestação. A histotrofia lipídica resulta em embriões que podem ter ganho uma ou duas ordens de grandeza a mais em massa do que os embriões de histotrofos limitados (Carrier *et al.*, 2004; Musick & Ellis, 2005).

## 2.4- Oofagia

Os embriões oófagos se alimentam de oócitos não fertilizados que a mãe continua a produzir e transportar para o útero até o final do período de gestação. Em pelo menos uma espécie, *Carcharias taurus*, a oofagia é precedida pela adelfofagia, na qual o embrião maior se alimenta de embriões menores em desenvolvimento e depois se alimenta de oócitos não fertilizados (oofagia) (Carrier *et al.*, 2004; Musick & Ellis, 2005).

## 2.5- Viviparidade Placentária

Os embriões das formas vivíparas placentárias são nutridos pelo vitelo armazenado no saco vitelino durante as primeiras semanas. À medida que o vitelo se esgota, o saco vitelino alonga-se e a sua superfície distal torna-se altamente vascularizada. No local em que a superfície vascularizada do saco vitelino toca a parede uterina, os tecidos da mãe e da prole crescem em contato íntimo, formando a placenta do saco vitelino. Uma vez que a placenta é formada, os nutrientes podem ser desviados para o embrião - em desenvolvimento - diretamente da corrente sanguínea da mãe (Carrier *et al.*, 2004; Musick & Ellis, 2005).

**Tabela 1.** Modos de Reprodução em Elasmobrânquios

	LECITOTROFIA	MATROTOFIA
<b>OVIPARIDADE</b>		
<b>Retida</b>	●	
<b>Estendida</b>	●	
<b>VIVIPARIDADE</b>		
<b>Lecitotrófica</b>	●	
<b>Histotrofia Lipídica</b>		●
<b>Histotrofia Limitada</b>		●
<b>Oofagia</b>		●
<b>Adelfofagia</b>		●
<b>Placentária</b>		●

## 3.0- Anatomia Básica do Macho (Elasmobrânquio)

Os órgãos internos dos machos incluem testículos, ductos genitais, a glândula de Leydig e a glândula alcalina. Os ductos genitais, pareados, cobrem os rins e consistem em dúctulos eferentes, epidídimo, ducto deferente e vesícula seminal.

Existem dois testículos alongados, intimamente associados a um órgão linfomieloide (epigonal), que apresentam duas funções: espermatogênese (geração de células germinativas) e esteroidogênese (secreção de hormônios esteroides) (Engel & Callard, 2005). Em animais imaturos, os testículos podem aparecer como uma massa discreta de tecido esbranquiçado ou uma faixa clara na superfície do órgão epigonal. Em animais

adultos, os testículos geralmente variam seu tamanho durante o ano, aumentando e inchando durante a estação reprodutiva e regredindo em outras épocas. Além do mais, tal órgão varia em morfologia e arranjo funcional de acordo com a espécie estudada (Carrier *et al.*, 2004). Nos elasmobrânquios, a unidade funcional do testículo é o espermatocisto, uma estrutura esférica que compreende muitos espermatoblastos, que consistem em células de Sertoli e suas células germinativas associadas (Carrier *et al.*, 2004).

Os espermatozoides são então liberados nos ductos eferentes e transportados para um epidídimo (geralmente) altamente contorcido, que pode ser visto ao longo da coluna vertebral em ambos os lados da aorta dorsal. Nos machos imaturos, o epidídimo tende a ser um tubo reto na superfície ventral dos rins (Carrier *et al.*, 2004).

Após um período de maturação nos epidídimos, os espermatozoides alcançam o ducto deferente, que gradualmente se alarga para formar as vesículas seminais. As vesículas seminais então se unem, dando origem a papila urogenital, que, por sua vez, se desemboca na cloaca (Carrier *et al.*, 2004).

Nos elasmobrânquios machos, as bordas medianas das nadadeiras pélvicas formam órgãos copulatórios conhecidos como cláspers ou mixopterígio. Ao atingir a maturidade, os cláspers calcificam, endurecem e formam articulações com a base da nadadeira pélvica (Carrier *et al.*, 2004). Embora a maioria dos estudos revele o uso de um único cláspers durante a cópula, relatos indicam que algumas espécies podem inserir ambos os cláspers, incluindo *Scyliorhinus canicula* (Leigh-Sharpe, 1920).

Associada ao epidídimo, está a glândula acessória de Leydig, que parece conter algumas células especializadas na produção de proteínas, o que explicaria os elevados níveis de proteínas presentes nos fluidos seminais (Jones & Lin, 1993).

A glândula alcalina (de Marshall), exclusiva dos batóides, localiza-se próxima à vesícula seminal, produzindo um fluido rico em eletrólitos, que tem um efeito positivo na ativação do esperma, aumentando assim a motilidade dos espermatozoides. Suspeita-se também que a produção de uma secreção altamente alcalina possa ter um papel na formação de tampões copulatórios (García-Salinas *et al.*, 2021; Hamlett, 1999; Lacy, 2005).

Já a glândula do cláspers, vista como uma massa subcutânea na base proximal de cada cláspers, secreta um fluido viscoso que também é acrescentado ao sêmen, com função ainda desconhecida (Carrier *et al.*, 2004).

Os tubarões apresentam ainda estruturas que armazenam água do mar, nomeadas de sacos de sifão, com duas possíveis funções: (1) propulsão do esperma ou (2) lavagem

de qualquer esperma - de outro macho - da vagina da fêmea antes da cópula (Pratt & Carrier, 2005).

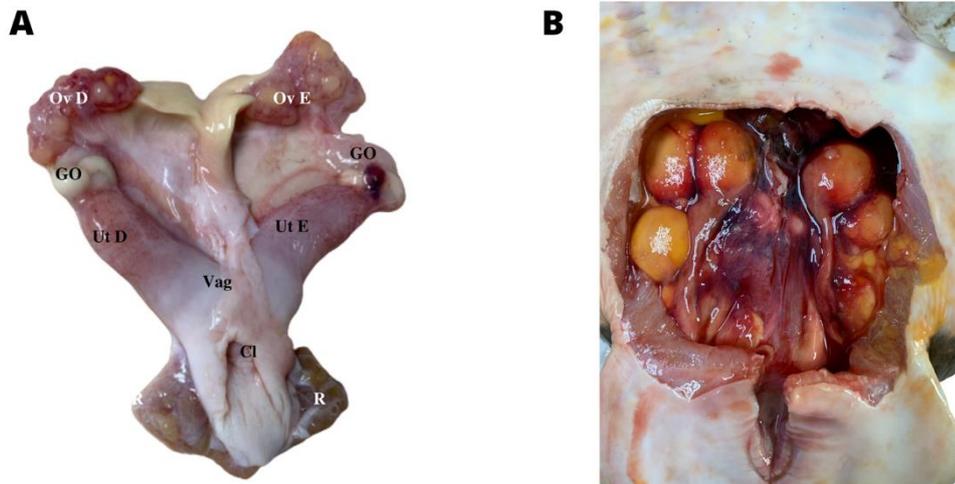
### 3.1- Anatomia Básica da Fêmea (Elasmobrânquio)

As fêmeas possuem ovários e ovidutos divididos em glândula nidamentária (ou nidamental, ou oviducal) e útero. Os ovários são estruturas únicas ou pareadas; sendo que, no último caso, a depender da espécie estudada, ambos os ovários podem ser desenvolvidos e funcionais ou, em outros casos, um ovário é funcional e o segundo é vestigial. Existem dois tipos de ovários: (1) o ovário interno nos lamniformes, no qual a cápsula ovariana está localizada dentro do órgão epigonal e produz inúmeros óvulos pequenos, que servirão como alimento na estratégia oofágica. (2) E o ovário externo, com origem na superfície plana do órgão epigonal ou ainda diretamente do mesovário (Carrier *et al.*, 2004).

Nas fêmeas imaturas, os ovários são pequenos e visíveis apenas como uma fina faixa de tecido granuloso. Já nas fêmeas maduras, os ovários são grandes, geralmente com oócitos vitelogênicos amarelos brilhantes na superfície (Carrier *et al.*, 2004).

A glândula oviducal tem a função de envolver os ovos fertilizados com uma camada nutritiva e protetora e, dependendo da espécie, é capaz de armazenar os espermatozoides por meses a anos. Essa glândula aparece como um leve inchaço em animais imaturos e como uma glândula bem diferenciada, com um diâmetro várias vezes superior ao dos ovidutos em animais maduros (Carrier *et al.*, 2004).

No útero ocorre o desenvolvimento do embrião. Na maioria dos casos, os embriões estão soltos no útero e em contato próximo uns com os outros. Em outras espécies eles podem estar em compartimentos separados ou criptas no útero. Os dois úteros se unem posteriormente para formar uma câmara, a vagina, que desemboca na cloaca (Carrier *et al.*, 2004).



**Figura 1. A:** visão ventral dos órgãos reprodutores da fêmea de raia-viola-de-focinho-curto (*Zapteryx brevirostris*) fora da cavidade celomática. Ambos os ovários e úteros são funcionais. **B:** útero de raia-viola-de-focinho-curto (*Zapteryx brevirostris*) apresentando oócitos vitelogênicos. Abreviações: **Cl**, cloaca; **GO**, glândula oviducal; **Ov D**, ovário direito; **Ov E**, ovário esquerdo; **R**, rim; **Ut D**, útero direito; **Ut E**, útero esquerdo; **Vag**, vagina.

#### 4.0- Maturidade Sexual em Elasmobrânquios

Para que haja sucesso no acasalamento, os elasmobrânquios machos devem apresentar cláspers funcionais - totalmente desenvolvidos - e espermatozoides maduros, prontos para serem transportados, com o auxílio do cláster, para a fêmea. Portanto, a maturidade masculina pode ser avaliada determinando se os cláspers estão calcificados e se espermatozoides são encontrados no interior das vesículas seminais. A calcificação do cláster pode ser uma maneira simples e rápida de determinar se os elasmobrânquios machos estão maduros; no entanto, as avaliações de maturidade baseadas apenas neste fator podem ser imprecisas, pois o desenvolvimento de tal órgão pode preceder a espermatogênese completa (Conrath, 2005).

Observação direta ou evidências histológicas confirmam a presença de esperma no sistema reprodutor, sendo que os espermatozoides podem ser visualizados através de cortes transversais ou esfregaços. Entretanto, elasmobrânquios machos maduros em estágio de repouso podem não possuir espermatozoides dentro das vesículas seminais; mas, nesses casos, o tamanho e a forma desse órgão devem ser bons indicadores de maturidade (Conrath, 2005).

Avaliações baseadas apenas na presença de esperma no sistema reprodutor também podem ser um tanto imprecisas, já que a mesma pode ocorrer antes que os

cláspers estejam totalmente funcionais (Conrath, 2005). A melhor abordagem para determinar a maturidade em elasmobrânquios machos deve, portanto, combinar um exame de rigidez e desenvolvimento do cláspers (através de um simples teste de campo) com práticas laboratoriais que possibilitem a detecção de espermatozoides nas vesículas seminais, ou que constatem se tais vesículas estão aumentadas, indicando um evento de acasalamento anterior (Conrath, 2005).

Ademais, em algumas espécies de batóides, relatou-se sincronização entre mudanças na morfologia dentária dos machos e seus ciclos reprodutivos (Rasch *et al.*, 2020).

Já as fêmeas de elasmobrânquios são consideradas maduras se houver indício de uma gestação atual ou anterior, ou ainda evidências de que estarão prontas para se reproduzirem dentro de um curto período de tempo. Para as fêmeas que não estão ou não estiveram prenhes, a maturidade pode ser determinada avaliando a condição dos óvulos no ovário e o tamanho do oviduto. As fêmeas que já estiveram prenhes terão um oviduto expandido, contendo glândulas oviducais e úteros bem desenvolvidos. A maturidade feminina pode, portanto, ser determinada avaliando a condição do sistema reprodutor e observando a presença ou ausência de oócitos bem desenvolvidos no ovário, ovos ou embriões dentro do sistema reprodutor ou ovidutos expandidos. A determinação da maturidade em fêmeas de elasmobrânquios depende em grande parte da observação e, portanto, tal avaliação será mais precisa quando um número significativo de animais imaturos, juvenis e maduros puder ser observado (Conrath, 2005).

#### 5.0- Reprodução em *Zapteryx brevirostris*

A raia-viola-de-focinho-curto é classificada, quanto ao modo de reprodução, em vivípara lecitotrófica. Segundo literatura, nascem de dois a oito embriões por gestação (Gomes, 2019). Entretanto, baseada em sua experiência com *Z. brevirostris* sob cuidados humanos, a autora da presente tese revela nunca ter constatado via ultrassom e/ou presenciado o nascimento de mais de seis embriões/fêmea/parto.

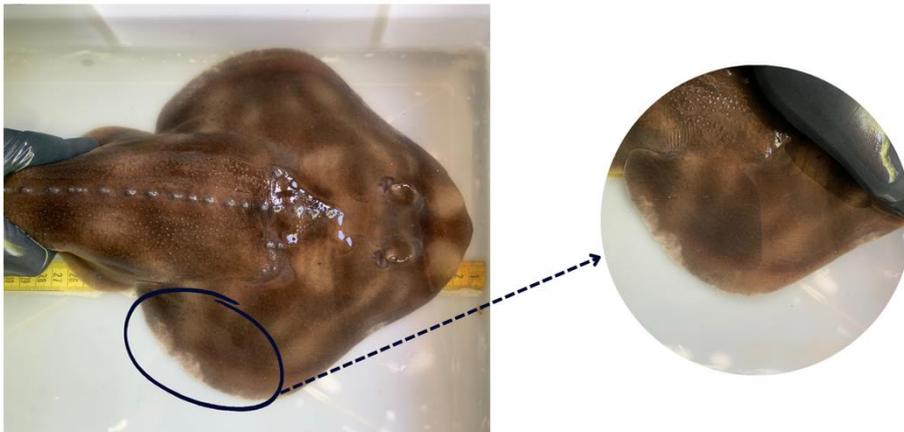
Apesar de nunca ter visualizado o exato momento da penetração do cláspers na cloaca da fêmea, a autora da tese em questão descreve alguns comportamentos de cópula observados nos espécimes que constituíam o plantel do Aquário de Ubatuba: (1) um ou mais machos perseguem a cauda da fêmea, tentando (várias vezes) agarrar a nadadeira peitoral da mesma (comportamento de perseguição); (2) um macho morde a ponta da

nadadeira peitoral da fêmea ou dois machos mordem a ponta de ambas as nadadeiras peitorais, estando um macho na nadadeira peitoral esquerda e outro, na direita.

Os cinco eventos de nascimento de filhotes de raia-viola-de-focinho-curto, no Aquário de Ubatuba, no período de 2019 a 2022, ocorreram nos meses de abril, maio ou junho. Em fevereiro de 2023, houve o nascimento de seis filhotes de uma mesma gestação.



**Figura 2.** Comportamento de cópula, dois machos mordendo as pontas das nadadeiras peitorais da fêmea de *Zapteryz brevirostris*.



**Figura 3.** Marcas de cópula (após mordidas) na margem posterior da nadadeira peitoral direita em *Zapteryz brevirostris*.

## 6.0- Estudo da Morfologia dos Espermatozoides em Elasmobrânquios

O espermatozoide de tubarões e raias é composto por cabeça, peça intermediária e cauda, apresentando uma estrutura exclusiva da classe de condrictes dentro dos peixes: a haste da peça intermediária axial (Jamieson, 2005).

Mais de 1200 espécies de elasmobrânquios foram descritas globalmente (Serena *et al.*, 2020), sendo ainda poucos os estudos voltados para a avaliação espermática dessas espécies, utilizando microscopia de luz e/ou microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão, a citar: *Squalus suckleyi* (Stanley 1964, 1965, 1970,1971), *Torpedo marmorata* (Stanley, 1964, 1966), *Scyliorhinus caniculus* (Stanley, 1964, 1966; Gusse & Chevallier, 1978), *Raja clavata* (Nicander, 1968), *Rhinobatos cemiculus* (Boisson *et al.*, 1968; Mattei, 1970), *Scyliorhinus* sp. (Stanley,1971), *Centrophorus atromarginatus* (Tanaka *et al.*, 1978), *Raja* sp. (Stanley, 1983), *Heterodontus portusjacksoni* (Jones *et al.*,1984), *Squalus acanthias* (Pudney & Callard, 1984), *Dasyatis garouensis* (Hara & Tanaka, 1986), *Galeorhinus galeus* (Van der Horst & McClusky, 1986), *Centroscymnus owstoni* (Hara & Tanaka,1986; Tanaka *et al.*,1995), *Chlamydoselachus anguineus* (Hara & Tanaka,1986; Tanaka *et al.*,1995), *Prionace glauca* (Hara & Tanaka, 1986), *Dasyatis margarita* (Mattei,1999), *Raja miraletus* (Mattei, 1999), *Rhinobatos schlegelii*, *Heterodontus japonicus*, *Orectolobus japonicus*, *Carcharias taurus*, *Alopias pelagicus*, *Isurus oxyrinchus*, *Carcharhinus plumbeus*, *Galeocerdo cuvier*, *Cephaloscyllium umbratile*, *Galeus eastmani*, *Galeus nipponensis*, *Cephaloscyllium umbratile*, *Hemitriakis japonica*, *Mustelus griseus*, *Mustelus manazo*, *Dalatias licha*, *Deania calcea*, *Deania historiosa*, *Etmopterus brachyurus*, *Etmopterus molleri*, *Etmopterus pusillus*, *Squalus brevirostris*, *Squalus japonicus*, *Squatina japonica*, *Torpedo tokionis*, *Urolophus aurantiacus*, *Myliobatis tobijei* (Tanaka *et al.*, 1995), *Sphyrna lewini* (Parsons & Grier,1992; Tanaka *et al.*, 1995), *Raja eglanteria* (Hamlett *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*,1995), *Torpedo nobiliana* (Mattei,1999), *Mustelus canis* (Hamlett *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*,1995), *Galeorhinus galeus* (McClusky, 2003), *Himantura signifer* (Chatchavalvanich, 2004), *Dasyatis kuhlii* (Hara & Tanaka 1986; Jamieson, 2005), *Chiloscyllium punctatum*, *Dasyatis fluviorum* (Jamieson, 2005).

Ademais, recentemente, pesquisas vêm sendo conduzidas objetivando o estabelecimento de protocolos que viabilizem a preservação do sêmen de elasmobrânquios (Arciniegas *et al.*, 2005; Garzón *et al.*, 2007; Peñaranda *et al.*, 2008; Daly & Jones, 2017; García-Salinas *et al.*, 2021).

Até onde se sabe, o presente estudo foi o primeiro a avaliar e descrever a morfologia do espermatozoide - via microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão - da raia-viola-de-focinho-curto, uma espécie ameaçada de extinção.

## OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho é de identificar os parâmetros andrológicos da raia-viola-de-focinho-curto, *Zapteryx brevirostris*, por meio de análises macro e microscópicas dos órgãos reprodutores do macho, assim como realizar a avaliação espermática, incluindo exames ultraestruturais do espermatozoide.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a eficiência das metodologias não letais - imobilização tônica, massagem abdominal e ultrassonografia - para a coleta de sêmen de *Zapteryx brevirostris*;
2. Avaliar a eficiência das metodologias - elegidas nesse estudo - para a avaliação espermática e ultraestrutural dos espermatozoides de elasmobrânquios;
3. Descrever e fotodocumentar a anatomia do trato reprodutor de macho de *Z. brevirostris*;
4. Apresentar a morfologia macroscópica dos órgãos reprodutos de machos adultos de *Z. brevirostris*, após estabelecida uma correlação entre achados de necropsia, calcificação do clássper e presença de espermatozoides nas lâminas histológicas da vesícula seminal;
5. Divulgar informações sobre a morfologia dos espermatozoides de *Z. brevirostris*, de modo que se possa estabelecer um comparativo com outras espécies de condrictes já estudadas, contribuindo assim para possíveis hipóteses de relações filogenéticas;
6. Gerar dados capazes de contribuir para possíveis estudos na área de preservação a curto e longo prazo dos espermatozoides de *Z. brevirostris*, o que possibilitaria a criação de um banco genético da espécie;
7. Destacar a importância dos estudos longitudinais realizados por aquários e zoológicos, contribuindo para a sustentabilidade dos seus plantéis e para a conservação das espécies *in situ*.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- Arciniegas, S. P.; Rodríguez, J. M.; Casallas, P. E. 2005. Ensayos preliminares sobre crioconservación de semen de bagre rayado Preliminary essays on crioconservation of semen of catfish “lined bagre”. *Orinoquía* 9, 28–37
- Boisson, C.; Mattei, X.; Mattei, C. 1968. La spermiogénèse de *Rhinobatus cemiculus* Geof. St-Hilaire [Sélacien Rhinobatidae]. Étude au microscope électronique. Institut Fondamental d’Afrique Noire. Bulletin Série A. (Sciences Naturelles) 30:659-673
- Carrier, J. C.; Pratt, H. L.; Castro, J. I. 2004. Reproductive biology of elasmobranchs. *Biology of sharks and their relatives*, 10: 269-286
- Castro, J. I. 1983. The Sharks of North American Waters. Texas A&M University Press, College Station
- Chatchavalvanich, K.; Thongpan, A.; Nakai, M. 2004. Ultrastructure of spermiogenesis in freshwater stingray, *Himantura signifier* Compagno and Roberts, 1982. Journal of Marine and Freshwater Research. <https://doi.org/10.1007/s10228-005-0300-8>
- Compagno, L. J. V. 2001. Sharks of the World. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes (Rome)
- Conrath, CI. Reproductive biology. 2005. In: Musick JA, Bonfil R, editors. Management and techniques for elasmobranch fishes. Rome: FAO, p.103-126
- Daly, J.; Holland, M.; Galloway, D. 2011. “Preliminary investigations on sperm cryopreservation of a stingray, the sparsely spotted stingaree,” in *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd Edn, eds T. R. Tiersch and C. C. Green (Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society), 337–344
- Engel, K.B.; Callard, G.V. 2005. The Testis and Spermatogenesis. In: Hamlett, W.C. (ed.) *Reproductive biology and phylogeny of chondrichthyes: sharks, rays and chimaeras*, pp. 171-200. Endfield, USA: Science Publishers
- García-Salinas, P.; Gallego, V.; Asturiano, J. F. 2021. Development of Sperm Cryopreservation Protocols for Sharks and Rays: New Tools for Elasmobranch Conservation. *Frontiers in Marine Science*, 941. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.689089>
- Garzón, D. L.; Peñaranda, D. S.; Pérez, L.; Marco-Jiménez, F.; Espert, X.; Müller, T. 2007. Effects of pH, sodium bicarbonate, cryoprotectants and foetal bovine serum on the cryopreservation of European eel sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 99–105. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00861.x>

- Gomes, U. L.; Signori, C. N.; Gadig, O. B. F.; Santos, H. R. S. 2010. Guia para identificação de tubarões e raias do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Technical Books
- Gusse, M.; Chevaillier, P. H. 1978. Etude ultrastructurale et chimique de la chromatine au cours de la spermiogenèse de la roussette *Scyliorhinus caniculus* (L). Cytobiologie 16: 421-443
- Hamlett, W. C. 1999. Male reproductive system, in Sharks, Skates, and Rays: The Biology of Elasmobranch Fishes. W. C. Hamlett, Ed., Johns Hopkins University Press, Baltimore, 444–471
- Hamlett, W. C.; Hysell, M. K.; Rozycki, T.; Brunette, N.; Tumilty, K.; Henderson, A.; Dunne, J. 1999. Sperm aggregation and spermatocyte formation in the male genital ducts in the clearnose skate, *Raja eglanteria*. Société Française d'Icthyologie, Paris, 1999: 281-291
- Hamlett, W. C.; Reardon, M.; Clark, J.; Walker, T. I. 2002. Ultrastructure of sperm storage and male genital ducts in a male holocephalan, the elephant fish, *Callorhynchus milii*. Journal of Experimental Zoology. 292(2): 111-128. <https://doi.org/10.1002/jez.1148>
- Hara, M.; Tanaka, S. 1986. Fine structure of spermatogenesis and mature spermatozoa in elasmobranch and chimaera fishes: A systematic consideration. Development Growth and Differentiation 28 (suppl): 114.
- Jamieson, B. G. 2005. Chondrichthyan spermatozoa and phylogeny. In *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes*. CRC Press, 211-246
- Jones, R. C.; Jones, W.; Djakiew, D. 1984. Luminal composition and maturation of spermatozoa in the male genital ducts of the Port Jackson shark, *Heterodontus portusjacksoni*. Journal of Experimental Zoology 230: 417-426. <https://doi.org/10.1002/jez.1402300311>
- Jones, R. C.; Lin, M. 1993. Structure and functions of the genital ducts of the male Port Jackson shark, *Heterodontus portusjacksoni*. Environ. Biol. Fish. 38:127–138. <https://doi.org/10.1007/BF00842909>
- Lacy, E. R. 2005. Alkaline Glands and Clasper Glands of Batoids: Glands. HAMLETT, WC, *Reproductive biology and phylogeny of chondrichthyes, sharks, batoids and chimaeras*: 336-360
- Leigh-Sharpe, W. H. 1920. The comparative morphology of the secondary sexual characteristics of elasmobranch fishes. Mem. J. Morphol. 34:245–265. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050420111>

- Martins, R.R.; Schwingel, P.R. 2003. Variação espaço-temporal da CPUE para o gênero *Rhinobatos* (Rajiformes, Rhinobatidae) na costa sudeste e sul do Brasil. 7:119-129
- Mattei, X. 1970. Spermio-genèse comparée des poissons. Pp. 57-69. In B. Baccetti (ed.), *Comparative Spermatology*. Academic Press, New York, NY
- Mattei, X. 1999. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology* 69: 3038-3055. <https://doi.org/10.1139/z91-428>
- Mc Clusky, L. M. 2003. A scanning electron microscope study of germ cell maturation in the reproductive tract of the male soupfin shark (*Galeorhinus galeus*). *Acta Zoologica (Stockholm)* 84: 69-76
- Musick, J. A.; Ellis, J. K. 2005. Reproductive evolution of chondrichthyans. *HAMLETT, WC, Reproductive biology and phylogeny of chondrichthyes, sharks, batoids and chimaeras*: 45-71
- Nicander, L. 1968. Gametogenesis and the ultrastructure of germ cells in vertebrates. *Proceedings of the VIth International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, Paris, Volume 1*: 89-107
- Parsons, G. R.; Grier, H. J. 1999. Seasonal changes in shark testicular structure and spermatogenesis. *The Journal of Experimental Zoology* 261: 173-184
- Peñaranda, D. S.; Pérez, L.; Gallego, V.; Barrera, R.; Jover, M.; Asturiano, J. F. 2008. European eel sperm diluent for short-term storage. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 407–415. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01206.x>
- Pratt Jr, H. L.; Carrier, J. C. 2005. Elasmobranch courtship and mating behavior. *HAMLETT, WC, Reproductive biology and phylogeny of chondrichthyes, sharks, batoids and chimaeras*: 129-170
- Pudney, J.; Callard, G. V. 1984. Development of agranular reticulum in Sertoli cells of the testis of the dogfish *Squalus acanthias* during spermatogenesis. *Anatomical Record* 209: 311-321. <https://doi.org/10.1002/ar.1092090309>
- Rasch, L. J.; Cooper, R. L.; Underwood, C.; Dillard, W. A.; Thiery, A. P.; Fraser, G. J. 2020. Development and regeneration of the crushing dentition in skates (Rajidae). *Developmental biology*, 466(1-2), 59-72. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.07.014>
- Serena, F.; Abella, A. J.; Bargnesi, F.; Barone, M.; Colloca, F.; Ferretti, F.; Moro, S. 2020. Species diversity, taxonomy and distribution of Chondrichthyes in the Mediterranean and Black Sea. *The European Zoological Journal*, 87(1), 497-536. <https://doi.org/10.1080/24750263.2020.1805518>

- Stanley, H. P. 1964. Fine structure and development of the spermatozoan midpiece in the elasmobranch fish *Squalus suckleyi*. *Journal of Cell Biology* 23: 88A. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(71\)80090-4](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(71)80090-4)
- Stanley, H. P. 1965. Fine structure of the tail flagella in the spermatozoa of two chondrichthyan fishes, *Squalus suckleyi* and *Hydrolagus colliei*. *Anatomical Record* 151: 419
- Stanley, H. P. 1966. The structure and development of the seminiferous follicle in *Scyliorhinus caniculus* and *Torpedo marmorata* (Elasmobranchii). *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 75: 453-468
- Stanley, H. P. 1970. Differential development of homologous structures accessory to the axoneme in sperm of several vertebrate types. Abstracts of the Tenth Annual Meeting American Society of Cell Biology: 201a
- Stanley, H. P. 1971. Fine structure of spermiogenesis in the elasmobranch fish *Squalus suckleyi*. I. Acrosome formation, nuclear elongation and differentiation of the midpiece axis. *Journal of Ultrastructure Research* 36: 86-102. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(71\)80090-4](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(71)80090-4)
- Stanley, H. P. 1983. The fine structure of spermatozoa of *Hydrolagus colliei* (Chondrichthyes, Holocephali). *Journal of Ultrastructure Research* 83: 184-194
- Tanaka, S.; Hara, M.; Mizue, K. 1978. Studies on sharks-XIII. Electron microscopic study on spermatogenesis of the squalen shark *Centrophorus atromarginatus*. *Japanese Journal of Ichthyology* 25(3): 173-180. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(83\)90076-x](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(83)90076-x)
- Tanaka, S.; Kurokawa, H.; Hara, M. 1995. Comparative morphology of the sperm in chondrichthyan fishes. Pp. 313-320. In B. G. M. Jamieson, J. Ausio and J.-L. Justine (eds), *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, 166
- Van der Horst, G.; McClusky, L. 1986. Scanning electron microscopy of the testicular ampullae and spermatocysts of the soupfin shark, *Galeorhinus galeus*. *Proceedings of the Electron Microscopy Society of South Africa* 16: 71-72

**ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO**

**Andrological study of shortnose guitarfish *Zapteryx brevirostris* (Müller & Henle, 1841) (Chondrichthyes, Rhinopristiformes)**

Artigo redigido nas normas do periódico científico

***Journal Fish of Biology***

QUALIS A2

**ANDROLOGIA DA RAIÁ-VIOLA-DE-FOCINHO-CURTO *Zapteryx brevirostris* (MÜLLER & HENLE, 1841) (CHONDRICHTHYES, RHINOPRISTIFORMES)**

CAMILO, L. O.<sup>1,2</sup>; MAGANHE, B. L.<sup>1,2</sup>; GALLO NETO, H.<sup>1</sup>; SANCHES, E. G.<sup>2</sup>

<sup>(1)</sup> Aquário de Ubatuba. Ubatuba/SP, Brasil

<sup>(2)</sup> Laboratório de Piscicultura Marinha, Instituto de Pesca. Ubatuba/SP, Brasil

*\*Autor correspondente: Laura de Oliveira Camilo (oliveiracamilo.laura@gmail.com)*

*Aquário de Ubatuba*

*Rua Guarani, 859*

*Ubatuba, São Paulo 11689-046, Brasil*

*Telefone/fax: (+55) 31-98846-2117*

Orcid:

Laura de Oliveira Camilo (0000-0001-9228-970X), Bruna Larissa Maganhe (0000-0001-9064-8596), Hugo Gallo Neto (0000-0001-7769-5638), Eduardo Gomes Sanches (0000-0001-9976-9271)

oliveiracamilo.laura@gmail.com, brunamaganhe@live.com  
hugo@aquariodeubatuba.com.br, eduardo.sanches2005@gmail.com

Declarações

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não têm interesses conflitantes.

Disponibilidade de dados e materiais

Os dados que apoiam as descobertas deste estudo estão disponíveis com o autor correspondente mediante solicitação.

Disponibilidade de código

Não aplicável.

## **Resumo**

O estudo andrológico de uma espécie compreende desde a análise macro e microscópica dos órgãos reprodutivos internos até a avaliação dos parâmetros seminais e características ultraestruturais do espermatozoide. Assim como em outros vertebrados, o trato reprodutor do macho em condrictes é composto de testículos e ductos reprodutivos (ducto eferente, epidídimo, glândula de Leydig, ducto deferente e vesícula seminal). Foram utilizados três espécimes adultos de *Zapteryx brevirostris* capturados *in situ* e mantidos no Aquário de Ubatuba, Brasil. A coleta de sêmen dos exemplares foi realizada via massagem abdominal, sobre a localização anatômica da vesícula seminal, sendo precedida por avaliação ultrassonográfica. O sêmen coletado foi diluído a 1:200 e submetido a análise quantitativa e morfológica. A análise ultraestrutural foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. Foi observada correlação entre coleta bem sucedida e imagem ultrassonográfica de vesícula seminal ingurgitada, assim como de testículos com margens facilmente delimitáveis e maior ecogenicidade. Foi possível identificar espermatozoides livres com aparência filiforme helicoidal, assim como spermatozeugmatas. A concentração média dos espermatozoides resultou em 5 milhões de pacotes por ml e 140 milhões de espermatozoides por ml. O núcleo do espermatozoide apresentou formato de cone, bainha de paracromatina menos densa que a cromatina do núcleo, suave depressão da fossa nuclear, axonema abaxial 9+2 e colunas axonemais acessórias na posição 3 e 8 e de formato ovalado, com superfície interior achatada em corte transversal. Esses resultados ampliam o conhecimento sobre a andrologia dessa espécie, contribuindo para programas de reprodução *ex situ*.

**Palavras-chaves:** Conservação; Elasmobrânquios; Espermatozoide; Reprodução; Sêmen; Spermatozeugmata

**Andrology of shortnose guitarfish *Zapteryx brevirostris* (Müller & Henle, 1841)**  
**(Chondrichthyes, Rhinobatidae)**

**Abstract**

The andrological study of a species comprises from the macro- and microscopic analysis of the internal reproductive organs to the evaluation of seminal parameters and ultrastructural characteristics of the spermatozoa. As in other vertebrates, the male reproductive tract in chondrichthyans is composed of testes and reproductive ducts (efferent duct, epididymis, Leydig's gland, ductus deferens and seminal vesicle). In this study we used three adult specimens of *Zapteryx brevirostris* from wild capture and kept at the Ubatuba Aquarium, Brazil. Semen collection was performed by abdominal massage, over the location of the seminal vesicle, preceded by ultrasonographic evaluation. The semen collected was diluted 1:200 and submitted to quantitative and morphological analysis. Ultrastructural analysis was performed by transmission and scanning electron microscopy. Correlation was observed between successful collection and ultrasonographic image of an engorged seminal vesicle, as well as testicles with easily delimitable margins and higher echogenicity. It was possible to identify free spermatozoa with helical filiform appearance, as well as spermatozeugmata. The average sperm concentration resulted in 5 million packets per ml and 140 million spermatozoa per ml. The sperm nucleus showed cone shape, parachromatin sheath less dense than the chromatin of the nucleus, smooth depression of the nuclear fossa, abaxial axoneme 9+2 and accessory axonemal columns in position 3 and 8 and oval shaped, with flattened inner surface in cross section. These results broaden the knowledge about the andrology of this species, contributing to ex situ breeding programs.

**Keywords:** Conservation; Elasmobranchs; Spermatozoa; Reproduction; Semen; Spermatozeugmata

## 1. INTRODUÇÃO

A raia-viola-de-focinho-curto, *Z. brevirostris* (Müller & Henle, 1841), é a única espécie do gênero *Zapteryx* encontrada no Atlântico Oeste. Sua distribuição geográfica compreende do sudeste do Brasil até Mar Del Plata, na Argentina (Gomes *et al.*, 2019). A espécie encontra-se descrita como ameaçada no livro vermelho da IUCN (*International Union for the Conservation of Nature*) e na lista nacional de espécies ameaçadas (Portaria MMA nº 148, de 07 de junho de 2022). Isso se deve ao fato de ser categorizada como "k estrategista", além da pressão da pesca que a espécie sofre, sendo capturada pela frota de pesca artesanal e considerada parte da fauna acompanhante da pesca de arrasto de camarão (*by-catch*) (Costa & Chaves, 2006; Bornatowski *et al.*, 2009; Robert, 2012).

O comprimento total (CT) máximo relatado para fêmeas de *Z. brevirostris* é de 661 mm, comparados com 635 mm para machos (Castello, 1971). Possui estágio de primeira maturação sexual quando atingem 420 mm de CT para fêmeas e 437 mm de CT para machos. A partir de 470 e 450 mm de CT, todas as fêmeas e machos, respectivamente, estão 100% maduros (Batista, 1987a). A proporção sexual pode variar de macho:fêmea 1:1 (Batista, 1987b; Colonello, 2011) até macho:fêmea 1:17 (Santos, 2006).

Os órgãos internos do sistema reprodutivo dos machos de elasmobrânquios incluem os testículos, ductos genitais, glândula de Leydig, glândula alcalina e a bolsa do cláster. Os espermatozoides são células únicas, produzidas nos testículos, por meio do processo de espermatogênese, no qual existem vários pontos de verificação para garantir a entrega de um produto de DNA de alta qualidade e fidelidade (Bertolla, 2020). O trajeto dos espermatozoides em raias e tubarões pode ser simplificado da seguinte maneira: dos ductos eferentes, eles seguem seu caminho através dos epidídimos altamente convolutos e que estão intimamente associados à superfície ventral de um órgão acessório chamado glândula de Leydig. Os espermatozoides passam por um período de maturação nos epidídimos antes de alcançarem o ducto deferente, que gradualmente se alarga para formar as vesículas seminais. As vesículas seminais então se unem, dando origem a papila urogenital, que, por sua vez, se desemboca na cloaca. Na cópula e ejaculação, os espermatozoides são transferidos da vesícula seminal, através da papila urogenital, para o sulco dorsal de cada cláster.

A análise do sêmen, como teste laboratorial padrão, fornece informações básicas sobre a espermatogênese, atividade secretora das gônadas e saúde reprodutiva do macho. Os resultados obtidos durante tal análise podem indicar tanto a ausência de espermatozoides ou desvios (graves ou leves) nos parâmetros espermáticos, assim como valores normais de volume de sêmen, contagem e concentração de espermatozoides, motilidade e morfologia dessas células. Em outras palavras, os

parâmetros do sêmen têm um papel de relevância tanto na concepção natural, quanto nos resultados das tecnologias de reprodução assistida (Sharma *et al.*, 2020).

Ainda de acordo com Mattei (1991), devido à grande diversidade estrutural para peixes em todos os níveis taxonômicos, não foi possível construir modelos espermáticos, mesmo para grupos monofiléticos como Elasmobranchii. Por essa razão, os resultados da ultraestrutura do esperma podem fornecer informações valiosas sobre as modificações celulares associadas aos hábitos reprodutivos, assim como revelar caracteres morfológicos úteis para hipóteses de relações filogenéticas (Baicere-Silva *et al.*, 2011; Burns *et al.*, 2002).

Tendo ciência que em aquários públicos ainda há pouco engajamento em relação à sustentabilidade do plantel animal (Buckley *et al.*, 2018; Daly & Jones, 2017; García-Salinas *et al.*, 2021a; Henningsen *et al.*, 2017) e visto o *status* “ameaçada” da espécie *Z. brevirostris*, fica clara a necessidade de desenvolvimento de estratégias para programas de conservação *ex situ* de tal espécie, por meio da conservação de seus espermatozoides, a curto e longo prazo, e da aplicação de técnicas de reprodução assistida. Os primeiros passos para o desenvolvimento das técnicas citadas anteriormente incluem o conhecimento da anatomia macro e microscópica do sistema reprodutor, além da coleta e caracterização do sêmen (Wyffels *et al.*, 2021). O objetivo do trabalho foi de identificar os parâmetros andrológicos da *Zapteryx brevirostris*, por meio de análises macro e microscópicas dos órgãos reprodutores, e realizar a avaliação espermática, incluindo exames ultraestruturais do espermatozoide.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Foram utilizados três espécimes de raia-viola-de-focinho-curto (*Z. brevirostris*) mantidos no Aquário de Ubatuba (Ubatuba/SP, Brasil; latitude, 23° 26' 47,71" S; longitude, 45° 4' 5,21" W) oriundos de captura incidental na pesca de camarões-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) (Heller, 1862). Um total de 6 espécimes microchipados foram mantidos na proporção macho:fêmea 1:1, em tanque de 5,2 m<sup>2</sup> de área, sem substrato, sob recirculação, acoplado a um sistema de 80.000 L, equipado com dois filtros de areia, injeção de ozônio, filtro biológico, lâmpadas ultravioleta, filtro de nitrato, skimmer e chiller. Os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados, duas vezes por semana, através da sonda comercial Hanna modelo HI 98194 e, sempre que necessário, corrigidos de modo a manter a salinidade em 31, temperatura em 22° C e o pH em 8,2. Os níveis de nitrogênio foram medidos através de testes comerciais (Alcon®), respeitando os limites recomendados por Mohan e Aiken (2004). Os animais eram, ainda, submetidos a um regime de fotoperíodo 12/12 e uma dieta a base de camarão-sete-barbas congelado (consumo *ad libitum*).

Na biometria prévia, os machos apresentavam 500, 470 e 459 mm de comprimento total; 218, 212 e 215 mm de largura de disco e 858, 770 e 650 g de peso respectivamente. Todos os exemplares estavam maduros de acordo com Batista (1987a). Na palpação, apresentaram cláspers rígidos.

O Aquário de Ubatuba é reconhecido por ser o primeiro aquário de visitação pública a documentar cientificamente o nascimento de filhotes de raias *Z. brevirostris* - cuja cópula ocorreu também dentro da instituição -, assim como os cuidados com esses recém-nascidos e a curva de crescimento até os 14 meses de idade (Maganhe *et al.*, 2022).

## **2.2 Anatomia e histologia dos órgãos**

Após o óbito de um dos machos, foi realizada a necropsia nas dependências do Aquário de Ubatuba. Com o animal posicionado em decúbito dorsal, a incisão, para acesso da cavidade celomática, foi realizada - ventralmente - em formato de “U”.

Para a realização da análise histológica, o trato reprodutivo completo do macho de *Z. brevirostris* foi removido, seccionado em cortes de 0,5 cm e fixado em formol 10% por 24 horas, sendo posteriormente preservado em etanol 70%.

A amostra foi desidratada em série de etanóis, em concentrações crescentes (de 70 a 100%), e diafanizada em xilol, com posterior inclusão em *paraplast*. Em seguida, o material foi cortado, através do micrótomo Leica RM 2065, em fragmentos de 3 µm de espessura, que foram então aderidos em lâminas de vidro. Essas lâminas foram mantidas em estufa a 60°C por 24 h, sendo, em seguida, sujeitas à passagem em baterias de xilol e álcool para a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE). Uma réplica foi submetida à coloração de Tricrômico de Masson. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio trinocular (ZEISS - Axiolmager.A2.m) no Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem - CADI- FMVZ-USP.

## **2.3 Ultrassom**

O macho foi retirado do tanque e mantido em uma caixa plástica de 540 mm de comprimento x 330 mm de largura x 120 mm de altura, contendo 10 L de água do aquário de origem e provida de aeração. Antes da coleta do esperma, com o espécime em posição dorsoventral, foi realizado um exame de ultrassom com o equipamento Mindray M6, acoplado a um transdutor convexo/linear de 3,5 MHz, objetivando a verificação da presença ou ausência de sêmen na vesícula seminal e a avaliação dos testículos.

## 2.4 Coleta de Sêmen

Após o exame de imagem, a imobilidade tônica foi induzida, sendo o espécime mantido em posição ventrodorsal e recebendo a aplicação de uma leve pressão no rostro. A cloaca foi emergida e seca com papel toalha. Uma pressão bilateral na região abdominal, sobre a localização anatômica da vesícula seminal, foi suficiente para fazer o esperma fluir pelas papilas urogenitais. O sêmen foi colhido diretamente em tubos graduados para centrifuga, tipo falcon, fabricados em polipropileno, com capacidade de 15ml. A amostra foi então submetida a análises via microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

## 2.5 Avaliação do sêmen

Imediatamente após a colheita, o sêmen foi avaliado quanto a parâmetros macroscópicos (coloração, aspecto e volume) e microscópicos (motilidade, vigor e morfologia espermática). 10 µl de sêmen foram alocados entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37° C e observados em microscopia óptica (Microscópio Binocular - N 107 Coleman®), para validação da presença dos espermatozoides, assim como a mensuração da motilidade e vigor espermáticos. Foram utilizados aumentos de 40x, 100x e 400x. O sêmen foi diluído 1:200 e o cálculo da concentração espermática foi feito na câmara de Neubauer. A análise da morfologia espermática se deu através de 2 metodologias distintas: (1) esfregação do sêmen corado com a coloração Panótico® e (2) preparação em câmara úmida, com diluição 1:20 em formol salina.

Uma amostra foi também desidratada em série de etanóis, em concentrações crescentes (de 70 a 100%), e diafanizada em xilol, com posterior inclusão em *paraplast*. Posteriormente, o material foi cortado, através do micrótomo Leica RM 2065, em fragmentos de 3 µm de espessura, que foram então aderidos em lâminas de vidro. Essas lâminas foram mantidas em estufa a 60°C por 24 h, sendo, em seguida, submetidas à passagem em baterias de xilol e álcool para a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio trinocular (ZEISS - Axiomager.A2.m) no Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem - CADI- FMVZ-USP.

## 2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para tal análise, as amostras foram (1) fixadas em paraformol 4% ; (2) desidratadas em séries crescentes de álcoois em concentrações de 70%, 80%, 90% e 100%; (3) secas em aparelho de ponto crítico LEICA EM CPD 300; (4) coladas com cola de carbono em bases metálicas de alumínio (*stub*); (5) metalizadas (*sputting*) com ouro no aparelho metalizador EMITECH K550 e, por fim, (6) analisadas e fotodocumentadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) LEO 435 VP, no Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem (CADI- FMVZ-USP).

## **2.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

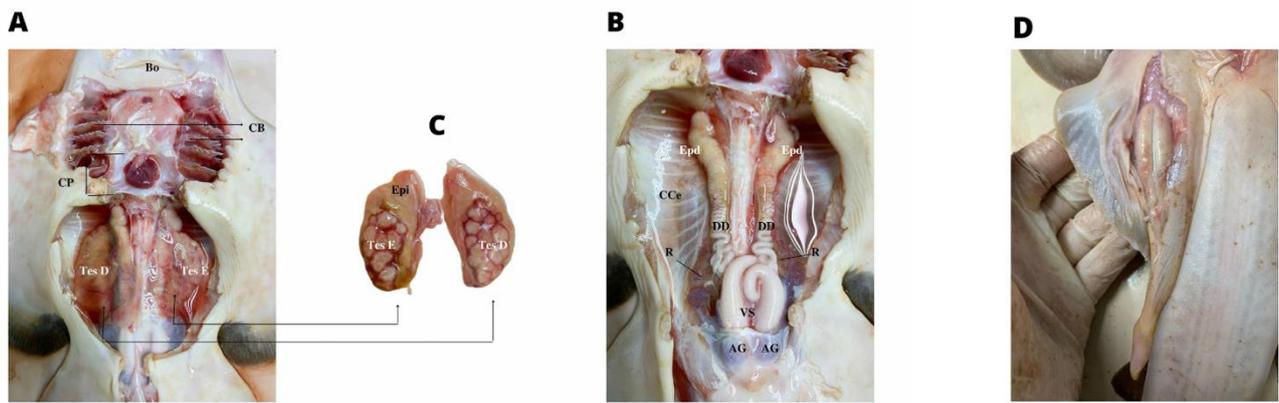
A preparação das amostras para a MET se deu da seguinte forma: (1) os *pellets* de espermatozoides foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,15M, pH 7,2, por 2 horas; (2) pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% em salina, contrastado em solução de acetato de uranila a 0,5% em salina, por 12 horas e (3) incluídos em resina Araldite. (4) Os cortes ultrafinos (70 nm) foram submetidos à contrastação dupla por acetato de uranila 2% e por citrato de chumbo 0,5%; sendo, por fim, (5) analisados no microscópio eletrônico de transmissão Morgagni 268D, no Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem - CADI- FMVZ-USP.

## **2.8 Código de ética**

O projeto foi legalmente sustentado pela Autorização de Uso e Manejo SMA/SP AM2856440 e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Aquário de Ubatuba (n°. 04/2021). Teve, ainda, como justificativa, a necessária ampliação do conhecimento sobre a reprodução de elasmobrânquios sob cuidados humanos. Foi utilizado o número mínimo de indivíduos necessários para obtenção das informações.

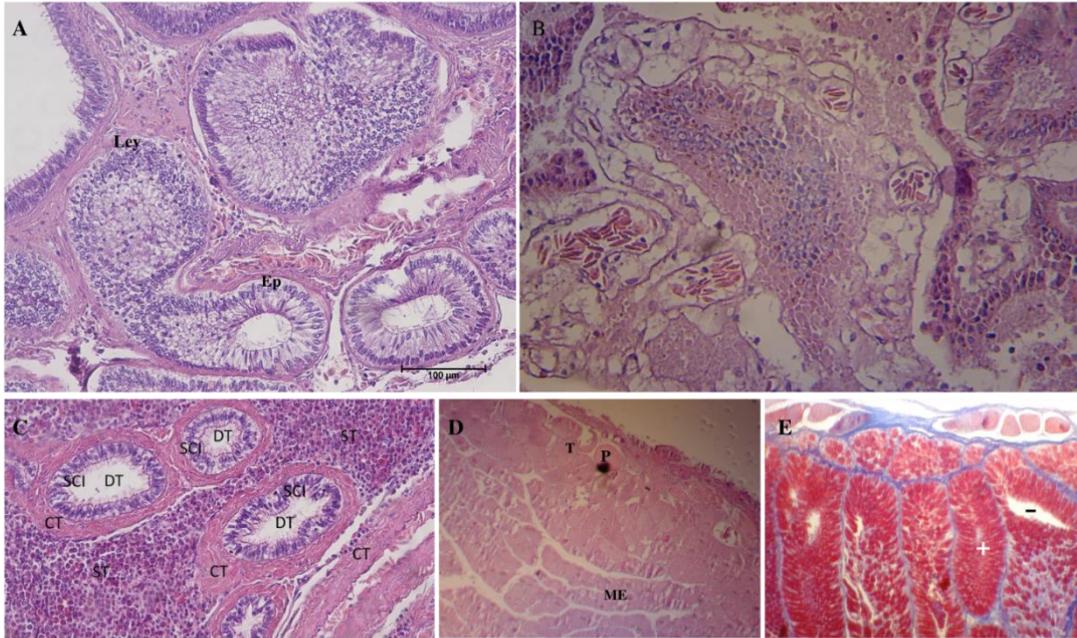
## **3. RESULTADOS**

A necrópsia permitiu avaliar a localização e o aspecto macroscópico dos órgãos do sistema reprodutor (Figura 1). O testículo apresentava lobulações na sua superfície dorsal, visíveis a olho nu, e limitação do epigonal à sua extremidade. Epidídimos e ductos deferentes mostravam-se altamente convolutos. A vesícula seminal já era percebida mesmo antes da retirada do fígado da cavidade celomática, com tamanho e conformação que permitiam, com facilidade, a sua diferenciação dos ductos deferentes. As glândulas do cláspere foram facilmente diferenciadas do tecido circundante e apresentavam coloração amarelo pálido. O comprimento do cláspere ultrapassava a nadadeira pélvica.

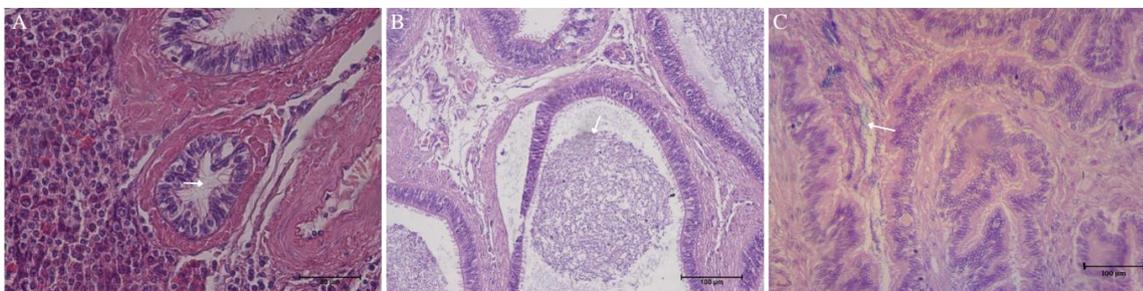


**FIGURA 1** Necropsia de raia-viola-de-focinho-curto (*Zapteryx brevirostris*) macho. **A:** visão ventral da cavidade celomática após a retirada da pele, musculatura, fígado e trato gastrointestinal. **B:** visão ventral dos órgãos sexuais na cavidade celomática após a retirada dos testículos. **C:** visão dorsal dos testículos. Legenda: **CCe**, cavidade celomática; **DD**, ductos deferentes; **Epd**, epidídimo; **Epi**, epigonal; **AG**, glândula alcalina; **R**, rim; **Tes D**, testículo direito; **Tes E**, testículo esquerdo; **VS**, vesícula seminal. **D:** glândula do cláspers em destaque

Os órgãos do sistema reprodutor masculino foram avaliados quanto à arquitetura histológica (Figura 2). Os ductos do testículo, o epidídimo, a vesícula seminal e a glândula de Leydig apresentavam epitélio do tipo colunar simples ciliado. O epitélio da glândula alcalina consistia em células colunares altas, sem cílios. A glândula do cláspers era composta por múltiplas unidades secretoras tubulares simples, dispostas radialmente em relação ao sulco ventral, onde se encontrava a papila; sendo que cada unidade glandular possuía um epitélio colunar simples e alto, composto por células secretoras com núcleos basais e citoplasma repleto de grânulos eosinofílicos. O epidídimo apresentava um lúmen amplo e vascularizado, com abundante quantidade de matriz formando um fluido denso, com aglomerados de espermatozoides em forma de *spermatozeugmata*. Espermatozoides foram visualizados também no lúmen dos ductos do testículo e vesícula seminal (Figura 3).

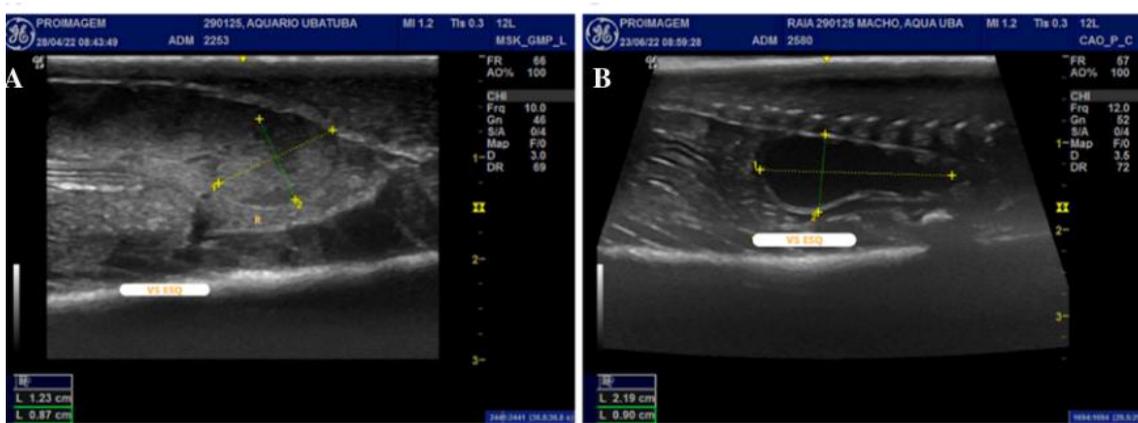


**FIGURA 2** Sistema reprodutor do macho de raia-viola-de-focinho-curto (*Zapteryx brevirostris*). **A:** arquitetura histológica da glândula de Leydig e epidídimo de espécime maduro (coloração HE, 100x). **B:** arquitetura histológica da glândula alcalina de espécime maduro (coloração HE, 100x). **C:** arquitetura histológica do testículo de espécime maduro (coloração HE, 100x). **D:** arquitetura histológica da glândula do cláspere de espécime maduro (coloração HE, 40x). **E:** arquitetura histológica da glândula do cláspere de espécime maduro, apresentando túbulos secretores com abundante secreção luminal (+) e outros sem secreção acumulada (-) (coloração Tricrômico de Masson, 100x). Legenda: **CT**, tecido conjuntivo; **DT**, ducto secretório; **Ep**, epidídimo; **Ley**, glândula de Leydig; **ME**, músculo estriado; **P**, papila; **SCI**, espermátocitos primários; **SP**, espermátides; **T**, túbulos ou unidades glandulares

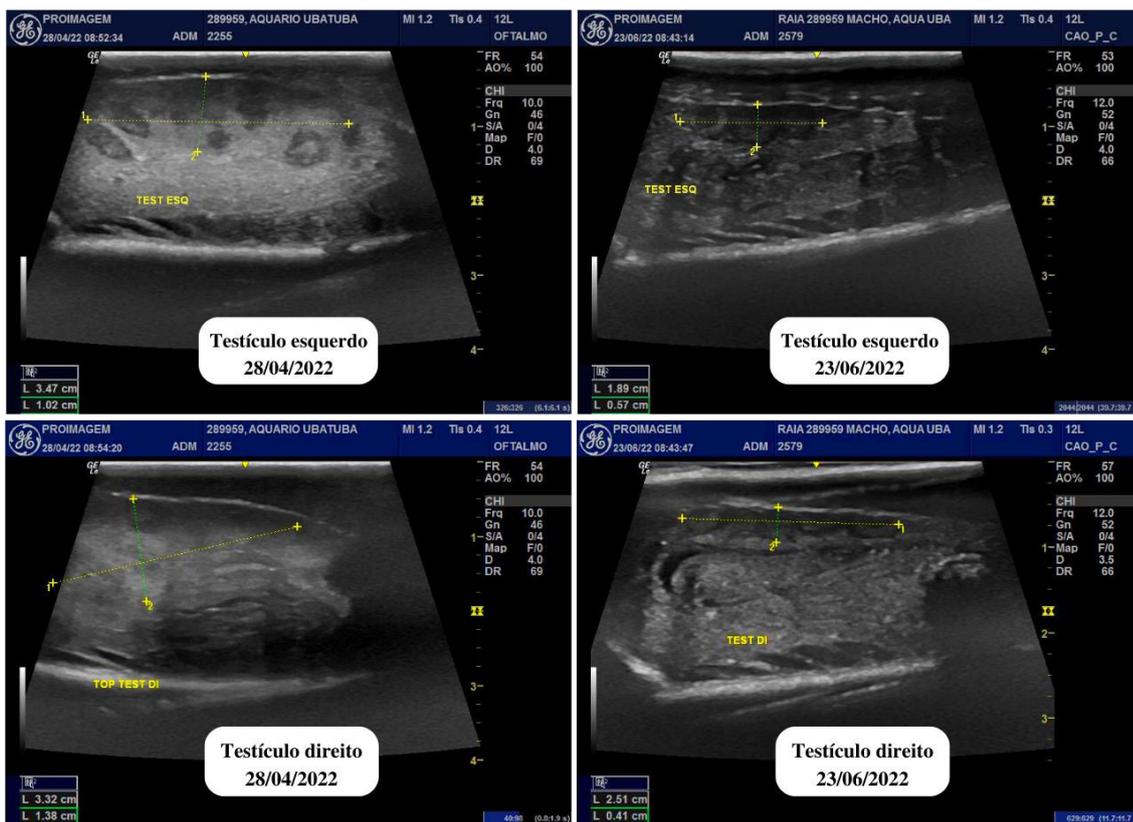


**FIGURA 3** Arquitetura histológica do testículo, epidídimo e vesícula seminal de espécime maduro de raia-viola-de-focinho-curto (*Zapteryx brevirostris*). As **setas brancas** indicam presença de espermatozoides livres ou em pacotes (coloração HE, 100x). Escala: 100 µm

O ultrassom foi realizado com o transdutor em orientação transversal, cranial à cintura pélvica, revelando cortes da vesícula seminal em formato ovalado. A imagem ultrassonográfica dos centros hipoecóicos heterogêneos ingurgitados indicava, possivelmente, a presença de conteúdo seminal (Figura 4). O exame de imagem também revelou variação sazonal no tamanho dos testículos: os testículos direito e esquerdo, em ambos os animais, apresentavam maiores valores de comprimento e largura, assim como maior ecogenicidade - e intensidade de pixels da imagem -, no final de abril quando comparado com as imagens realizadas no final de junho (Figura 5).

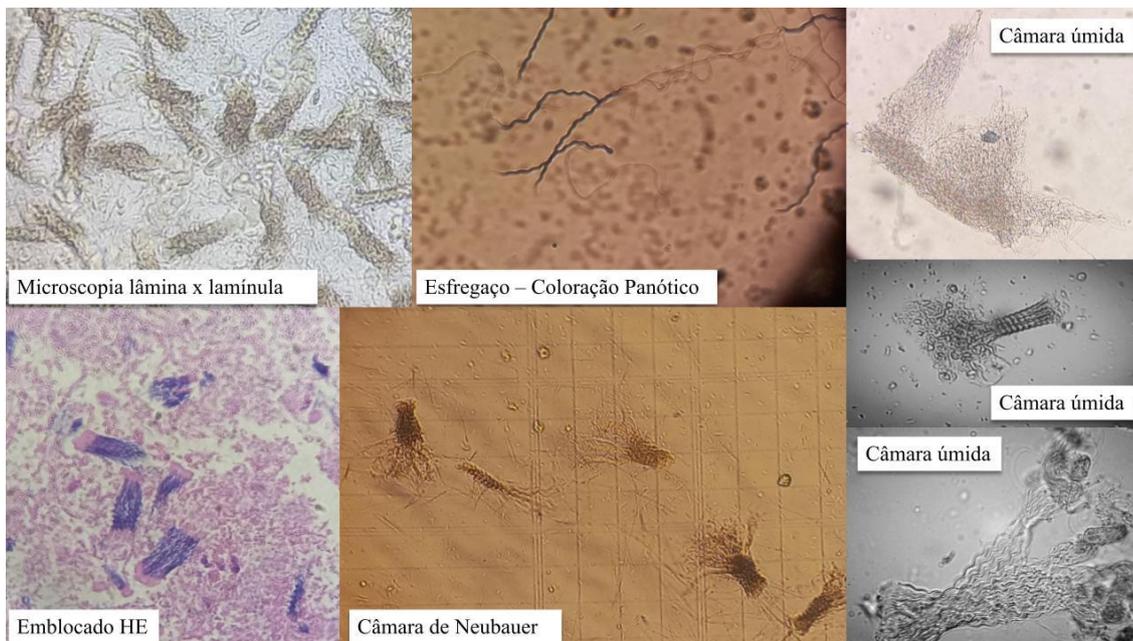


**FIGURA 4** Avaliação ultrassonográfica da vesícula seminal de raia-viola-de-focinho-curto (*Zapteryx brevirostris*) no dia 28/04/22 (A) e no dia 23/06/22 (B). O conteúdo da vesícula seminal mostra-se hipoecóico quando comparado com o rim (R)

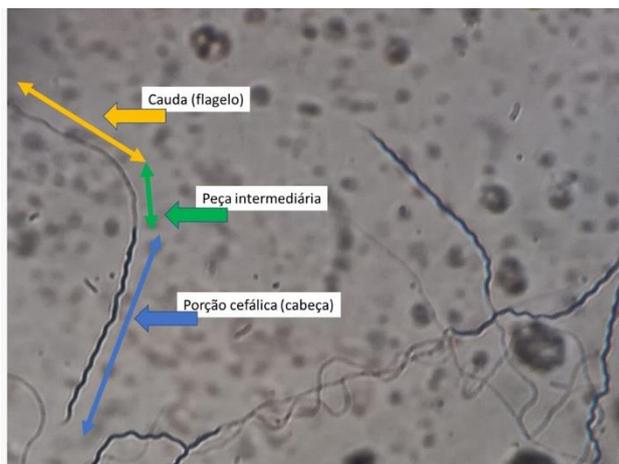


**FIGURA 5** Avaliação ultrassonográfica de testículo direito e esquerdo de raia-viola-de-focinho-curto (*Zapteryx brevirostris*) comparando duas datas. Ambos os testículos estão maiores em termos de comprimento e largura, além de apresentarem maior ecogenicidade, no final de abril

Os ejaculados foram coletados de 2 machos no dia 28/04/2022. As amostras apresentaram os seguintes parâmetros seminais: coloração marfim, aspecto cremoso, volume total de 0,9 ml. Durante a observação do sêmen na microscopia óptica, notou-se que muitos dos espermatozoides estavam fortemente empacotados na região da porção cefálica (cabeça) (Figura 6). Não foi possível determinar com precisão a motilidade progressiva espermática devido à presença concomitante de pacotes de espermatozoides e espermatozoides livres. Mas, foi possível observar que os espermatozoides estavam em estado móvel no sêmen fresco (ou puro). Os espermatozoides que estavam livres tinham a aparência filiforme helicoidal. A concentração média dos espermatozoides resultou em 5 milhões de pacotes por ml e 140 milhões de espermatozoides por ml. Foi possível a identificação da morfologia com a coloração Panótico Rápido® e lâmina úmida, sendo visualizada a porção cefálica (ou cabeça), a peça intermediária e a cauda (ou flagelo) (Figura 7).



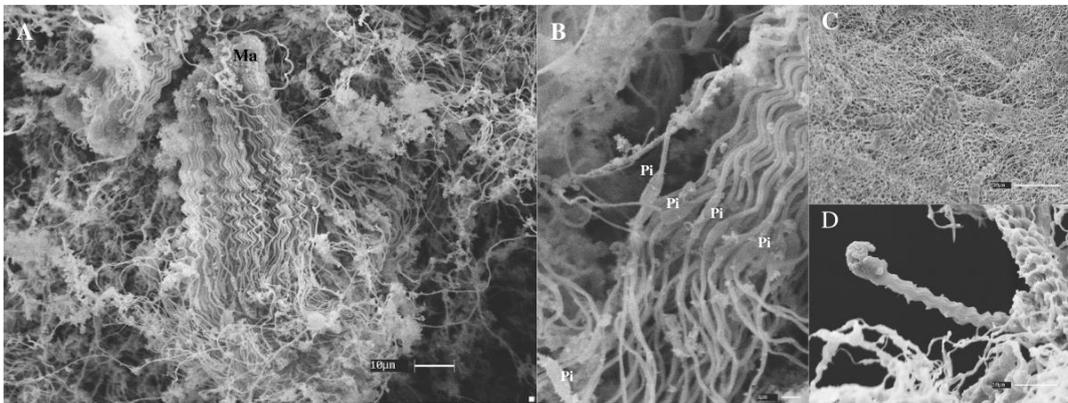
**FIGURA 6** Análise da morfologia espermática em raia-viola-de-focinho-curto (*Zapteryx brevirostris*) através de diferentes técnicas. Observa-se espermatozoides livres e em pacotes



**FIGURA 7** Espermatozoide de raia-viola-de-focinho-curto (*Zapteryx brevirostris*) avaliado a partir do esfregaço do sêmen corado com a coloração de Panótico®. Destaque para os três principais componentes: porção cefálica (ou cabeça), peça intermediária e cauda (ou flagelo).

Na MEV, foram observadas massas circulares de espermatozoides, nas quais as cabeças dos espermatozoides estavam alinhadas lado a lado e embutidas em uma matriz seminal, enquanto suas caudas se estendem para fora (Figura 8). Em *Z. brevirostris*, a peça intermediária é mais curta, mas

apresenta maior largura, quando comparada com a cabeça. Ademais, foi observado que a peça intermediária, nessa espécie, não é helicoidal.



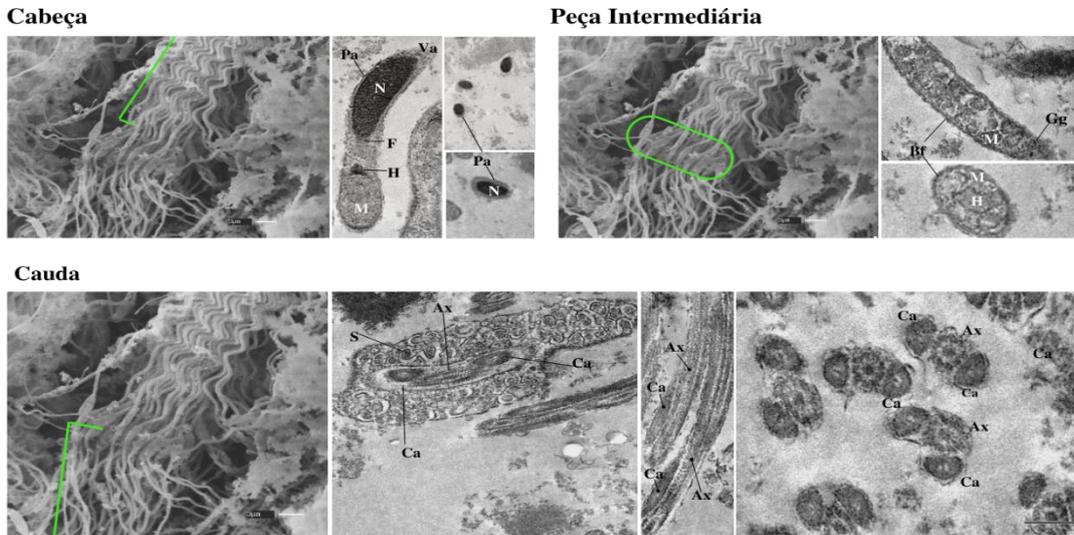
**FIGURA 8** Micrografias eletrônicas de varredura realizadas a partir da amostra de sêmen de raia viola-de-focinho-curto (*Zapteryx brevirostris*), confirmando a presença de *spermatozeugmatas*. Legenda: **Ma**, matriz; **Pi**, peça intermediária. Escala em A e D: 10 µm; escala em B: 3 µm; escala em C: 30 µm.

Após a análise dos resultados da MET, foi observado que o núcleo do espermatozoide de *Z. brevirostris* (1) apresenta-se no formato de cone, pontiagudo na sua extremidade anterior; (2) a cromatina densa é envolta por uma bainha de paracromatina de menor densidade (coloração acinzentada) e (3) a depressão da fossa nuclear é suave.

A peça intermediária parece consistir em um aglomerado de mitocôndrias aproximadamente isodiamétricas, tendo como componentes uma haste axial central, que se encaixa em uma reentrância na extremidade posterior do núcleo, enquanto a sua extremidade posterior se insere no corpo basal (centríolo distal) do flagelo. A peça intermediária é circundada por uma bainha fibrosa que se sobrepõe à extremidade posterior do núcleo. Há presença de *sleeve* citoplasmático, funcionando como uma “manga” que recobre a peça intermediária e o flagelo.

A cauda, originária da extremidade posterior da peça intermediária, contém um axonema 9 + 2, abaxial, acompanhado por duas colunas longitudinais (colunas axonemais acessórias). Tais colunas

longitudinais, por sua vez, estão na posição 3 e 8 e apresentam formato oval em corte transversal, com superfície interior achatada (Figura 9).



**FIGURA 9** Micrografias eletrônicas de varredura e transmissão de cortes longitudinais e transversais dos componentes do espermatozoide da raia viola-de-focinho-curto (*Zapteryx brevirostris*). Legenda: **Ax**, axonema; **Ca**, colunas axonemais acessórias; **Bf**, bainha fibrosa da peça intermediária; **F**, fossa nuclear basal; **Gg**, grânulos de glicogênio; **H**, haste axial da peça intermediária; **M**, mitocôndria na peça intermediária; **N**, núcleo; **Pa**, paracromatina; **S**, *sleeve* citoplasmático **Va**, vesícula acrossomal

#### 4. DISCUSSÃO

Em razão da rigidez do clássper, constatada por uma simples palpação do órgão, somada a visualização de espermatozoides nas lâminas histológicas confeccionadas a partir de cortes da vesícula seminal, pode-se concluir que o macho que veio à óbito já havia alcançado a sua maturidade sexual. Logo, a descrição morfológica dos órgãos - encontrada nesse estudo - é eficiente para classificar se determinado indivíduo de *Z. brevirostris* é ou não um adulto.

A morfologia comprimida do testículo em *Z. brevirostris* é típica de Batoidea. O órgão epigonal está limitado principalmente à extremidade do testículo, uma vez que a razão epigonal/tecido testicular germinativo decresce ao longo dos estágios de maturidade sexual, em virtude do desenvolvimento desse tecido testicular germinativo. Tal desenvolvimento também possibilita que a natureza lobular da superfície externa do órgão esteja visível a olho nu (Basallo *et al.*, 2018).

Os ductos reprodutivos são altamente convolutos em *Z. brevirostris* adultos e na maioria das espécies de elasmobrânquios. Uma exceção é a espécie *Gymnura poecilura* (Shaw, 1804), na qual a ausência de enovelamento resulta em órgãos consideravelmente mais curtos. Tal achado pode estar relacionado ao fato de que os espermatozoides permanecem na forma livre, não agregados, ao longo de todo sistema reprodutor do macho de *G. poecilura* (Henderson *et al.*, 2014).

Nos machos imaturos, o epidídimo aparece como um ducto praticamente fechado, com um lúmen estreito e sem espermatozoides; enquanto que nos machos maduros, o órgão é maior e vascularizado, com abundante quantidade de matriz seminal formando um fluido denso com aglomerados de espermatozoides (Basallo *et al.*, 2018). Esse último padrão foi o observado no macho de *Z. brevirostris* necropsiado. Também, em um elasmobrânquio imaturo, o epitélio dos túbulos da glândula de Leydig tendem a mostrar pouca ou nenhuma atividade secretora, como relatado por Basallo (2018) em *Sympterygia acuta* (Garman, 1877) e *Sympterygia bonapartii* (Müller & Henle, 1841), e diferente do encontrado para *Z. brevirostris*.

O epitélio da glândula alcalina em *Z. brevirostris*, sob microscopia de luz, apresentou as mesmas características relatadas para *Raja erinacea* (Mitchill, 1825) (Hamlett, 1999) e *G. poecilura* (Henderson *et al.*, 2013). Acredita-se que as secreções da glândula tenham um efeito positivo na ativação do esperma, aumentando assim a motilidade dos espermatozoides (García-Salinas *et al.*, 2021; Hug *et al.*, 2000).

No indivíduo necropsiado, a glândula do clássper mostrava-se desenvolvida. De acordo com Anaya-López & Ramírez-Pinilla (2017), o tamanho da glândula do clássper varia significativamente entre machos maduros e juvenis *versus* imaturos. Na histologia, o fato de a glândula apresentar túbulos secretores com abundante secreção luminal e outros sem secreção acumulada, é sugestivo de uma assincronia no processo secretor do órgão.

A coleta do esperma foi precedida pela realização do exame de imagem. Estabeleceu-se uma correlação entre obtenção do sêmen e imagem ultrassonográfica da vesícula seminal ingurgitada. Tal metodologia também foi implantada com sucesso para tubarões da espécie *Carcharias taurus* (Rafinesque, 1810) (Wyffels *et al.*, 2020). Adicionalmente, houve a avaliação dos testículos, que apresentaram maior tamanho e ecogenicidade quando a vesícula seminal se apresentava ingurgitada e, concomitantemente, quando a coleta de sêmen era possível. Em outras palavras, a avaliação ultrassonográfica é útil para a análise da atividade testicular (espermatogênese) em *Z. brevirostris*.

A coleta de sêmen em elasmobrânquios pode ocorrer via massagem na região abdominal, sobre a vesícula seminal, ou através da utilização de uma cânula ou cateter, inserido através da papila urogenital (García-Salinas *et al.*, 2021b; Wyffels *et al.*, 2021). Ambos os métodos exigem conhecimento da anatomia da espécie manejada. A coleta via massagem foi a opção elegida dada a sua aplicabilidade e menor risco de lesão de estruturas internas, uma vez que a raia-viola-de-focinho-curto, por ser um elasmobrânquio de pequeno porte, apresenta um diâmetro de papila consideravelmente reduzido.

Apesar de não ter sido possível determinar, com precisão, a motilidade progressiva espermática devido à presença concomitante de espermatozoides livres e em pacotes, foi visualizado que o sêmen fresco (ou puro) de *Z. brevirostris* já apresentava espermatozoides em estado móvel. Essa observação corrobora com o estudo realizado com *Hypanus americanus* (Hildebrand & Schroeder, 1928) (Gillis *et al.*, 2021), mas contrasta com as pesquisas realizadas com *C. taurus* (Wyffels *et al.*, 2020) e *Chiloscyllium plagiosum* (Bennett, 1830) (Wyffels *et al.*, 2020). No caso das espécies de tubarões citadas anteriormente, houve a necessidade de adição de água salgada artificial para início da motilidade espermática.

Novos estudos devem procurar responder questões quanto à produção do sêmen de *Z. brevirostris* ao longo do ano e a variação na sua concentração. Mudanças na qualidade do sêmen podem acompanhar um padrão reprodutivo sazonal, como foi descrito para espécies terrestres sazonais (Hofmann & Landeck, 1999). O entendimento da sazonalidade da reprodução ajudará no manejo da espécie em zoológicos e aquários, permitindo que os gestores identifiquem a melhor época do ano para treinar a coleta voluntária de sêmen, estabelecer a maturidade sexual, avaliar as capacidades reprodutivas, assim como diagnosticar anormalidades reprodutivas.

Através da avaliação via microscopia óptica de luz e eletrônica, foi constatada a presença de *spermatozeugmatas* no sêmen de *Z. brevirostris*; ou seja, pacotes de espermatozoides incorporados em uma matriz, apresentando alinhamento das suas cabeças. A produção de uma matriz fortemente glicosilada, juntamente com outras secreções luminiais das glândulas de Leydig e contribuições dos ductos genitais, cria um ambiente que possivelmente protege e nutre o esperma (Jamieson, 2005).

Os pacotes de espermatozoides são observados no sêmen de muitas espécies de elasmobrânquios (Pratt & Tanaka, 1994; Wyffels *et al.*, 2021) e podem servir para minimizar a perda de espermatozoides durante a cópula, aumentar a eficiência do armazenamento de espermatozoides no sistema reprodutor do macho e da fêmea ou, ainda, preservar a longevidade e a motilidade dos

espermatozoides durante o armazenamento (Pratt & Tanaka, 1994). Os *spermatozeugmats* de *Z. brevirostris* são semelhantes às agregações circulares de espermatozoides, contendo matriz, encontradas em *Heterodontus portusjacksoni* (Meyer, 1793), *Raja eglanteria* (Bosc, 1802) e *Galeorhinus galeus* (Linnaeus, 1758) (Jones & Jones, 1982; Jones & Hamlett, 2006; Mcclusky, 2015). E marcadamente diferentes dos feixes de espermatozoides alinhados lateralmente observados em *Squalus acanthias* (Linnaeus, 1758) e *Hydrolagus colliciei* (Lay & Bennett, 1839) (Pratt & Tanaka, 1994), ou do envolvimento completo do esperma pela matriz luminal para formar *spermatophores*, como observado em *Cetorhinus maximus* (Gunnerus, 1765) (Matthews, 1950), *Callorhynchus mili* (Bory de Saint-Vincent, 1823) (Hamlett *et al.*, 2002) e *C. taurus* (Wyffels *et al.*, 2020).

A morfologia básica do espermatozoide de *Z. brevirostris* é semelhante a encontrada em outras espécies de condrictes: (1) uma cabeça em forma de hélice, contendo núcleo e acrossoma; (2) uma peça intermediária com a presença de mitocôndrias e (3) uma cauda contendo axonema e colunas acessórias. Até onde se sabe, esta é a primeira vez que imagens de microscopia eletrônica de varredura e transmissão de espermatozoides foram estudadas nessa espécie.

A cabeça da maioria das espécies de elasmobrânquios avaliados apresentou formato helicoidal. Entretanto, em *Chlamydoselachus anguineus* (Garman, 1884), em *Dalatis licha* (Bonnaterre, 1788) e em *Squatina japonica* (Bleeker, 1858), foi observado que a ponta da cabeça do espermatozoide dobrava-se como um arpão (Jamieson, 2005).

O núcleo possui cromatina altamente condensada e eletrodensa, além de apresentar formato de cone, com a região posterior arredondada e presença de uma depressão, denominada fossa nuclear basal, que acomoda a ponta da haste da peça intermediária axial; sendo essa última estrutura (haste axial) exclusiva da classe condrictes dentro dos peixes (Temple-Smith *et al.*, 2018; Jamieson, 2005). Nos espermatozoides de *Z. brevirostris*, a fossa nuclear tem delimitação pouco marcada, diferente de espécies como *Dasyatis kuhlii* (Müller & Henle, 1841) e *Hemitrygon fluviorum* (Ogilby, 1908), nas quais essa fossa é acentuada (Jamieson, 2005).

*Z. brevirostris* e as outras espécies de elasmobrânquios até hoje estudadas apresentam peça intermediária de menor comprimento que a cabeça (Jamieson, 2005). Em contraste, todas as espécies examinadas de Holocephali (quimeras) apresentam uma peça intermediária longa em comparação com a cabeça (Jamieson, 2005). A peça intermediária pode ainda apresentar formato helicoidal, a exemplo de *Squalus suckleyi* (Linnaeus, 1758), ou não, a citar *Z. brevirostris* e *Scyliorhinus canicula* (Girard, 1855) (Muñoz-Baquero *et al.*, 2021).

Em raias e tubarões, o arranjo microtubular do axonema pode apresentar padrão 9+2 ou 9+0 (Temple-Smith *et al.*, 2018). No caso da espécie avaliada, o padrão encontrado foi 9+2. Para produzir a motilidade dos espermatozoides, o axonema gira ao longo do comprimento do flagelo. Em contraste, as colunas longitudinais permanecem fixas em posições duplas 3 e 8 (Temple-Smith *et al.*, 2018). Tais características permitem a criação de uma estrutura de dupla hélice (Jamieson, 2005). Os movimentos cilíndricos giratórios, em torno de seu eixo longo, também já foram descritos para espermatozoides de outras espécies de raias (Dzyuba *et al.*, 2019), bem como de tubarões (Minamikawa & Morisawa, 1996; Wyfels *et al.*, 2020; Wyfels *et al.*, 2021) e outros vertebrados; sugerindo que seja um movimento realizado para deslocamento no interior do sistema reprodutor da fêmea e para a fertilização.

O axonema é abaxial não só em *Z. brevirostris*, mas também em *H. collieim* (Jamieson, 2005). Entretanto, situa-se ao longo do eixo central em *S. suckleyi* (Jamieson, 2005). As colunas axonemais acessórias em tubarões *S. suckleyi* (Girard, 1854), *C. anguineus* (Garman, 1884), *Centroscymnus owstoni* (Garman, 1906), *Prionace glauca* (Lineu, 1758) e *Chiloscyllium punctatum* (Müller & Henle, 1838) são descritas como estruturas de formato ovalado em corte transversal, às vezes lembrando a forma de um rim, devido ao fato de que a parede mediana, por ser mais fina que a parede lateral, pode ser recuada (Jamieson, 2005). Esse mesmo formato foi identificado, nesse estudo, para *Z. brevirostris*. Entretanto, as espécies de raias *Himantura signifer* (Compagno and Roberts, 1982), *D. kuhlii* e *H. fluviorum* apresentaram espermatozoides com a presença de duas colunas axonemais acessórias arredondadas (Chatchavalvanich *et al.* 2004; Jamieson, 2005).

A metodologia utilizada cumpriu seu objetivo de ser útil na avaliação de parâmetros andrológicos da *Z. brevirostris*. Investigações envolvendo raias viola-de-focinho-curto de vida livre devem ser propostos, sem, entretanto, ser esquecido o papel fundamental de aquários e zoológicos como geradores de conhecimento. Dado o *status* de “ameaçada” da espécie *Z. brevirostris* e considerando a maior exigência financeira e logística para fazer observações de animais *in situ*, estudos longitudinais em zoológicos e aquários são capazes de alavancar o conhecimento sobre aspectos reprodutivos da espécie e, conseqüentemente, contribuir para a sustentabilidade dos plantéis, assim como para o manejo das populações selvagens. Portanto, as instituições, ao redor do mundo, que mantêm animais sob cuidados humanos, deveriam estreitar as parcerias na área da pesquisa científica, contribuindo para o aumento da dimensão das amostras (n).

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Aquário de Ubatuba e a sua equipe técnica pelo apoio durante o manejo e manutenção *ex situ* da espécie *Z. brevirostris*.

## REFERÊNCIAS

- Anaya-López, P., & Ramírez-Pinilla, M. P. (2017). Clasper gland morphology and development in *Potamotrygon magdalenae* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). *Journal of Morphology*, 278, 369-379. <https://doi.org/10.1002/jmor.20647>.
- Baicere-Silva, C. M., Ferreira, K. M., Malabarba, L. R., Benine, R. C., & Quagio-Grassiotto, I. (2011). Spermatic characteristics and sperm evolution on the subfamily Stevardiinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 9, 377-392. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252011005000014>.
- Basallo, A., Varela, A. S. J., & Oddone, M. C. (2018). Histology of the testicles and male reproductive tract of the skates *Sympterygia acuta* (Garman, 1877) and *S. bonapartii* (Müller & Henle, 1841) (Chondrichthyes: Rajoidei) in the Western South Atlantic Ocean. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 13, 148-161.
- Batista, V. S. (1987a). Desenvolvimento sexual de *Zapteryx brevirostris* (Müller & Henle, 1841) no litoral do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*, 47, 301-307.
- Batista, V. D. S (1987b). Length-weight relationship of the little guitarfish, *Zapteryx brevirostris* (Chondrichthyes: Rhinobatidae), from Itaipu inlet, Rio de Janeiro, Brazil. *Copeia*, 3, 787-789.
- Bertolla, R. P. (2020). Sperm biology and male reproductive health. *Scientific Reports*, 10, 1-3. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78861-7>.
- Bornatowski, H., Abilhoa, V., & Charvet-Almeida, P. (2009). Elasmobranchs of the Paraná Coast, southern Brazil, south-western Atlantic. *Marine Biodiversity Records*, 2, 158. <https://doi.org/10.1017/S1755267209990868>.
- Buckley, K. A., Crook, D. A., Pillans, R. D., Smith, L., & Kyne, P. M. (2018). Sustainability of threatened species displayed in public aquaria, with a case study of Australian sharks and rays. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 28, 137-151. <https://doi.org/10.1007/s11160-017-9501-2>.
- Burns, J. R., Meisner, A. D., Weitzman, S. H., & Malabarba, L. R. (2002). Sperm and spermatozeugma ultrastructure in the inseminating catfish, *Trachelyopterus lucenai*

(Ostariophysii: Siluriformes: Auchenipteridae). *Copeia*, 2002, 173-179.  
<https://doi.org/10.1643/0045-8511>.

Castello, J. P. (1971). Contribution to the systematic and biological knowledge of *Zapteryx brevirostris* (Müller and Henle, 1841) from the Atlantic coast off Mar del Plata (Chondrichthyes, Rhinobatidae). *Physis*, 30, 619-629.

Chatchavalvanich, K., Thongpan, A., & Nakai, M. (2005). Structure of the testis and genital duct of freshwater stingray, *Himantura signifer* (Elasmobranchii: Myliobatiformes: Dasyatidae). *Ichthyological Research*, 52, 123-131.  
<https://doi.org/10.1080/07924259.2006.9652214>.

Colonello, J. C., Garcia, M. L., & Menni, R. C. (2011). Reproductive biology of the lesser guitarfish *Zapteryx brevirostris* from the south-western Atlantic Ocean. *Journal of Fish Biology*, 78, 287-302. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02864>.

Costa, L., & Chaves, P. D. T. D. C. (2006). Elasmobrânquios capturados pela pesca artesanal na costa sul do Paraná e norte de Santa Catarina, Brasil. *Biota Neotropica*, 6, 1-6.  
<https://doi.org/10.1590/S1676-06032006000300007>.

Daly, J., & Jones, R. (2017). The use of reproductive technologies in breeding programs for elasmobranchs in aquaria. In M. Smith, D. Walmorts, D. Thoney, R. Hueter, M. Murray, & J. Ezcurra (Eds.), *The elasmobranch husbandry manual*, 363–374. Columbus: Ohio Biological Survey, 363-374. ISBN 978-0-86727-166-9.

Dzyuba, V., Sampels, S., Ninhaus-Silveira, A., Kahanec, M., Veríssimo-Silveira, R., Rodina, M., & Dzyuba, B. (2019). Sperm motility and lipid composition in internally fertilizing ocellate river stingray *Potamotrygon motoro*. *Theriogenology*, 130, 26-35.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.029>.

García-Salinas, P., Gallego, V., & Asturiano, J. F. (2021a). Development of Sperm Cryopreservation Protocols for Sharks and Rays: New Tools for Elasmobranch Conservation. *Frontiers in Marine Science*, 941. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.689089>.

García-Salinas, P., Gallego, V., & Asturiano, J. F. (2021b). Reproductive Anatomy of Chondrichthyans: Notes on Specimen Handling and Sperm Extraction. I. Rays and Skates. *Animals*, 11, 1888. <https://doi.org/10.3390/ani11082191>.

Gillis, J. D., Penfold, L. M., & Mylniczenko, N. D. (2021). Initial Characterization of Male Southern Stingray (*Hypanus americanus*) Reproductive Parameters and Preliminary Investigation of Sperm Cryopreservation. *Animals*, 11, 2716. <https://doi.org/10.3390/ani11092716>.

- Gomes, U. L., Santos, H. R. S., Gadig, O. B. F., Signori, C. N., & Vicente, M. M. (2019). Guia para identificação dos tubarões, raias e quimeras do Rio de Janeiro (Chondrichthyes: Elasmobranchii e Holocephali). *Revista Nordestina de Biologia Paraiba*, 27, 171-368.
- Hamlett, W. C. (Ed.). (1999). *Sharks, skates, and rays: the biology of elasmobranch fishes*. JHU Press.
- Hamlett, W. C., Reardon, M., Clark, J., & Walker, T. I. (2002). Ultrastructure of sperm storage and male genital ducts in a male holocephalan, the elephant fish, *Callorhynchus milii*. *Journal of Experimental Zoology*, 292, 111-128. <https://doi.org/10.1002/jez.1148>.
- Hammerschlag, N., Skubel, R. A., Sulikowski, J., Irschick, D. J., & Gallagher, A. J. (2018). A comparison of reproductive and energetic states in a marine apex predator (the tiger shark, *Galeocerdo cuvier*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 91, 933-942. <https://doi.org/10.1086/698496>.
- Henderson, A. C., Reeve, A. J., & Ambu-Ali, A. (2014). Microanatomy of the male and female reproductive tracts in the long-tailed butterfly ray *Gymnura poecilura*, an elasmobranch with unusual characteristics. *Journal of Fish Biology*, 84, 297-313. <https://doi.org/10.1111/jfb.12282>.
- Henningsen, A., Street, E. P., Claus, E., Street, E. P., Littlehale, D., Choromanski, J., & Willson, K. (2017). Reproduction of the sand tiger sharks, *Carcharias taurus*, in aquaria: A framework for a managed breeding program. In M. Smith, D. Walmorts, D. Thoney, R. Hueter, M. Murray, & J. Ezcurra (Eds.), *The elasmobranch husbandry manual*, 375-390. Columbus: Ohio Biological Survey.
- Hoffmann, B., & Landeck, A. (1999). Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. *Animal reproduction science*, 57, 89-98. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(99\)00050-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(99)00050-0).
- Hug, M. J., Gangyopadhyay, N., & Frizzell, R. A. (2000). Regulated ion transport in the alkaline gland of the little skate (*Raja ericacea*). *Bulletin of the Mount Desert Island Biological Laboratory*, 39, 92-94.
- Hussey, N. E., Cocks, D. T., Dudley, S. F., McCarthy, I. D., & Wintner, S. P. (2009). The condition conundrum: application of multiple condition indices to the dusky shark *Carcharhinus obscurus*. *Marine Ecology Progress Series*, 380, 199-212. <https://doi.org/10.3354/meps07918>.
- Jamieson, B. G. (2005). Chondrichthyan spermatozoa and phylogeny. In *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes*. CRC Press, 211-246.
- Jones, C. J., & Hamlett, W. C. (2006). Ultrastructure of the male genital ducts of the clearnose skate *Raja eglanteria*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 305, 1018-1029. <https://doi.org/10.1002/jez.a.329>.

- Jones, N., & Jones, R. C. (1982). The structure of the male genital system of the Port Jackson shark, *Heterodontus portujacksoni*, with particular reference to the genital ducts. *Australian Journal of Zoology*, 30, 523-541. <https://doi.org/10.1071/ZO9820523>.
- Maganhe, B. L., Camilo, L. O., Kurokawa, R. E., Gallo Neto, H., & Sanches, E. G. (2022). Birth and Growth of the Shortnose Guitarfish *Zapteryx Brevirostris* (Müller & Henle, 1841) (Chondrichthyes, Rhinobatidae) in Captivity. *Journal of Fish Biology*. 1–9. <https://doi.org/10.1111/jfb.15245>.
- Mattei, X. (1991). Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology*, 69, 3038-3055. <https://doi.org/10.1139/z91-428>.
- Matthews, L. H. (1950). Reproduction in the basking shark, *Cetorhinus maximus* (Gunner). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 234(612), 247-316. <https://doi.org/10.1098/rstb.1950.0003>.
- McClusky, L. M. (2015). Sperm of *Galeorhinus galeus* (Elasmobranchii, Triakidae) traverse an excurrent duct system characterized by pronounced regionalization: a scanning electron and light microscopy study. *The Anatomical Record*, 298, 1938-1949. <https://doi.org/10.1002/ar.23204>.
- Minamikawa, S., & Morisawa, M. (1996). Acquisition, initiation and maintenance of sperm motility in the shark, *Triakis scyllia*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 113, 387-392. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)02080-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)02080-2).
- Mohan, P. J., & Aiken, A. (2004). Water quality and life support systems for large elasmobranch exhibits. In M. Smith, D. Walmorts, D. Thoney, R. Hueter, M. Murray, & J. Ezcurra (Eds.), *The elasmobranch husbandry manual*, 69–88. Columbus: Ohio Biological Survey.
- Muñoz-Baquero, M., Marco-Jiménez, F., García-Domínguez, X., Ros-Santaella, J. L., Pintus, E., Jiménez-Movilla, M., & García-Vazquez, F. A. (2021). (*Scyliorhinus canicula*): aquarium-housed vs. wild-captured. *Animals*, 11, 2884. <https://doi.org/10.3390/ani11102884>.
- Mylniczenko, N. D., Sumigama, S., Wyffels, J. T., Wheaton, C. J., Guttridge, T. L., DiRocco, S., & Penfold, L. M. (2019). Ultrasonographic and hormonal characterization of reproductive health and disease in wild, semiwild, and aquarium-housed southern stingrays (*Hypanus americanus*). *American journal of veterinary research*, 80, 931-942. <https://doi.org/10.2460/ajvr.80.10.931>.
- Pratt Jr, H. L., & Tanaka, S. H. O. (1994). Sperm storage in male elasmobranchs: a description and survey. *Journal of Morphology*, 219, 297-308. <https://doi.org/10.1002/jmor.1052190309>.
- Robert, M. C. (2012). A captura de elasmobrânquios na costa paranaense. In Bornatowski, H., & Abilhoa, V. (Eds.), *Tubarões e raias capturados pela pesca artesanal no Paraná - guia de identificação*, 27–34. Curitiba, PR: Hori cadernos tecnicos n.4.

- Santos, C., Cortellete, G. M., Araújo, K. C. B., & Spach, H. L. (2006). Estrutura populacional da raia-viola *Zapteryx brevirostris* (Chondrichthyes, Rhinobatidae), na Plataforma adjacente à Baía de Paranaguá, PR. *Acta Biologica Leopondensia*, 28, 32-37.
- Sharma, N., Chakrabarti, S., Barak, Y., & Ellenbogen, A. (Eds.). (2020). *Innovations In Assisted Reproduction Technology*. BoD–Books on Demand.
- Sheldon, J. D., Allender, M. C., George, R. H., Bulman, F., & Abney, K. (2018). Reproductive hormone patterns in male and female cownose rays (*Rhinoptera bonasus*) in an aquarium setting and correlation to ultrasonographic staging. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 49, 638-647. <https://doi.org/10.1638/2017-0247.1>.
- Tanaka, S. (1995). Comparative morphology of the sperm in chondrichthyan fishes. *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*.
- Temple-Smith, P., Ravichandran, A., & Horta, F. (2018). Sperm: comparative vertebrate. *Encyclopedia of Reproduction*, 2, 210-220.
- Wyffels, J. T., Adams, L. M., Bulman, F., Fustukjian, A., Hyatt, M. W., Feldheim, K. A., & Penfold, L. M. (2021). Artificial insemination and parthenogenesis in the whitespotted bamboo shark *Chiloscyllium plagiosum*. *Scientific reports*, 12, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88568-y>.
- Wyffels, J. T., George, R., Adams, L., Adams, C., Clauss, T., Newton, A., & Penfold, L. M. (2020). Testosterone and semen seasonality for the sand tiger shark *Carcharias taurus*. *Biology of Reproduction*, 102, 876-887. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz221>.

## Considerações Finais

Técnicas não letais, incluindo a ultrassonografia e a coleta de sêmen, bem como a sistematização de protocolos de manejo espécie-específicos, estão substituindo métodos de amostragem letais para caracterização do estado reprodutivo de um indivíduo.

A obtenção de amostras de sêmen via massagem abdominal é uma técnica não invasiva e pode ser repetida com frequência. Ademais, pode ser precedida pelo exame de ultrassonografia, uma vez que o presente trabalho estabeleceu uma correlação entre a aparência ultrassonográfica da vesícula seminal e a capacidade de coleta de um ejaculado. Tal exame de imagem também se mostrou útil para acompanhamento do tamanho e ecogeneidade dos testículos ao longo do ciclo reprodutivo. Novos estudos devem procurar responder questões quanto à produção do sêmen de *Z. brevirostris* durante diferentes épocas do ano e a variação na sua concentração.

Outros ganhos expressivos obtidos com este estudo foram a apresentação da morfologia macroscópica dos órgãos reprodutores do macho adulto de raia-viola-de-focinho-curto e a divulgação de dados obtidos via microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão sobre a morfologia dos seus espermatozoides, de modo que se possa estabelecer um comparativo com outras espécies de condrictes já estudadas, contribuindo assim para estudos de relações filogenéticas.

Os declínios populacionais de tubarões e raias, nas últimas décadas, são consequência principalmente da sobrepesca e representam um risco para o equilíbrio do ecossistema; já que, ao ocuparem o topo da cadeia alimentar, os elasmobrânquios regulam os comportamentos e estoques de organismos que ocupam níveis tróficos mais baixos. É, portanto, incontestável a necessidade de realização de estudos que avaliem os aspectos reprodutivos das espécies de elasmobrânquios.

Por fim, vale ressaltar que os resultados desse estudo são capazes de contribuir com as pesquisas que visam desenvolver protocolos de preservação do sêmen de elasmobrânquios a curto e longo prazo, de inseminação artificial e de criação de um banco de dados genéticos, favorecendo a sustentabilidade dos plantéis das instituições que

mantêm raias e tubarões sob cuidados humanos, assim como os programas de conservação *in situ*.