

Colheita e criopreservação de sêmen post-mortem em raia pelágica (*Pteroplatytrygon violacea*): relato de caso

Laura de Oliveira Camilo¹, Eduardo Gomes Sanches², Antonio Carlos Dertonio Donato³, Silvia Edelweiss Crusco⁴

¹Projeto Selva Zoológico Taubaté, ²Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Norte Ubatuba, ³Mirai Centro de Diagnóstico Veterinário, ⁴SOS REPRO Desenvolvimento Profissional e Educacional Ltda
E-mail: oliveiracamilo.laura@gmail.com

A raia-pelágica, *Pteroplatytrygon violacea* (Bonaparte, 1832), é uma espécie de elasmobrânquio de médio a grande porte, pertencente à família Dasyatidae, com ampla distribuição pelágica em regiões tropicais e temperadas de todos os oceanos, sendo considerada de ocorrência circungal. Um exemplar macho de raia-violácea foi encontrado vivo e encalhado na Praia do Itaguá, em Ubatuba, SP, Brasil, apresentando ferimentos ao longo do corpo. O animal foi encaminhado para um tanque hospital (aquário hospital), onde foi submetido à colheita de sangue para análises bioquímicas e hematológicas, que revelaram hipoglicemia e leucocitose. Diante dos achados clínico-laboratoriais, instituiu-se tratamento com antibioticoterapia, hidroterapia e alimentação por sondagem. Após três dias consecutivos de tratamento, o animal veio a óbito. O corpo foi encaminhado ao setor de necropsia e, aproximadamente três horas após a morte, realizou-se a colheita de sêmen por massagem manual. Em seguida, procedeu-se à necropsia, com descrição macroscópica dos órgãos reprodutivos e colheita de fragmentos para análise histopatológica. O sêmen foi colhido diretamente em tubo falcon graduado (volume total de 2 mL) e imediatamente diluído na proporção de 1:10 em água do aquário (salinidade de 31 ppt), à temperatura de 28°C. A amostra diluída foi mantida sob refrigeração a 5°C, em caixa térmica com gelo biológico, e transportada de Ubatuba para São Paulo, em um trajeto de aproximadamente seis horas. Ao chegar ao laboratório, o sêmen foi avaliado por microscopia quanto a parâmetros microscópicos (motilidade, vigor e morfologia espermática). 20 µL de sêmen foram alocados entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 25°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. Foram observados espermatozoides com motilidade de 40% e vigor 2, presentes tanto em espermatozeugmata (espermatozoides agrupados) quanto na forma livre. A análise da morfologia dos espermatozoides livres se deu por meio de 2 metodologias distintas: (1) esfregaço do sêmen corado com a coloração Panótico® e (2) preparação em câmara úmida, com diluição 1:20 em formol salina. Eles apresentavam morfologia filiforme e motilidade progressiva, padrão comumente descrito para a maioria dos elasmobrânquios. Posteriormente, a amostra de sêmen foi adicionada ao diluidor à base de Tris-frutose-ácido cítrico contendo 5% de glicerol, na proporção de 1:1. A amostra foi então envasada em palhetas de 0,5 mL e submetida ao protocolo de criopreservação. As palhetas foram armazenadas em botijão de nitrogênio líquido (-196 °C) e descongeladas após 10 dias. Após o descongelamento do sêmen, realizado a 37°C por 30 segundos, observou-se 5% dos espermatozoides com motilidade e vigor 1. Foi possível realizar a colheita e a criopreservação de sêmen de *Pteroplatytrygon violacea* em três horas após o óbito do animal. O protocolo emergencial de transporte em água do aquário (o que ativa os espermatozoides) pode ter sido a principal causa da baixa viabilidade pós descongelação. Embora preliminar, o resultado demonstra potencial para a preservação de gametas e abre perspectivas para estudos futuros e aplicações em programas de conservação da espécie.

Palavras-chave: raia violácea, elasmobrânquio, sêmen, conservação

Autorizações legais: CEUA/Aquário de Ubatuba: nº 04/2024; CEP 11689-046. Autorização de Uso e Manejo da Espécie: nº AM2856440; SMA/SP

Post-mortem semen collection and cryopreservation in pelagic stingray (*Pteroplatytrygon violacea*): case report

Laura de Oliveira Camilo¹, Eduardo Gomes Sanches², Antonio Carlos Dertonio Donato³, Silvia Edelweiss Crusco⁴

¹Projeto Selva Zoológico Taubaté, ²Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Norte Ubatuba, ³Mirai Centro de Diagnóstico Veterinário, ⁴SOS REPRO Desenvolvimento Profissional e Educacional Ltda
E-mail: oliveiracamilo.laura@gmail.com

The pelagic stingray, *Pteroplatytrygon violacea* (Bonaparte, 1832), is a medium- to large-sized elasmobranch belonging to the family Dasyatidae, with a wide pelagic distribution in tropical and temperate regions of all oceans, being considered a circumglobally species. A male specimen of pelagic stingray was found alive and stranded at Itaguá Beach, in Ubatuba, São Paulo, Brazil, presenting injuries along the body. The animal was transferred to a hospital tank (aquarium hospital), where blood samples were collected for biochemical and hematological analyses, which revealed hypoglycemia and leukocytosis. Based on the clinical and laboratory findings, treatment was initiated with antibiotic therapy, hydrotherapy, and tube feeding. After three consecutive days of treatment, the animal died. The body was sent to the necropsy sector and approximately three hours after death, semen was collected by manual massage. Subsequently, a necropsy was performed, including macroscopic description of the reproductive organs and collection of tissue fragments for histopathological analysis. The collected semen was placed directly into a graduated Falcon tube (total volume of 2 mL) and immediately diluted at a 1:10 ratio in aquarium water (salinity of 31 ppt) at a temperature of 28°C. The diluted sample was kept under refrigeration at 5°C in a thermal box with biological ice, and transported from Ubatuba to São Paulo, in a journey of approximately six hours. Upon arrival at the laboratory, the semen was evaluated by microscopy for microscopic parameters (motility, vigor, and sperm morphology). Twenty microliters (20 µL) of semen were placed between a slide and coverslip to 25°C and observed under optical microscopy (Binocular Microscope – N107 Coleman®) to confirm the presence of spermatozoa and to assess sperm motility and vigor. Magnifications of 40×, 100×, and 400× were used. Spermatozoa with 40% motility and a vigor score of 2 were observed, both in spermatozeugmata (aggregated spermatozoa) and in free form. The morphology of free spermatozoa was analyzed using two distinct methodologies: semen smear stained with Panótico® stain, and wet mount preparation, with dilution 1:20 in saline formalin. The spermatozoa presented filiform morphology and progressive motility, a pattern commonly described for most elasmobranchs. Subsequently, the semen sample was added to a Tris–fructose–citric acid extender containing 5% glycerol, at a 1:1 ratio. The sample was then packaged into 0.5 mL straws and subjected to a cryopreservation protocol. The straws were stored in a liquid nitrogen tank (–196 °C) and thawed after 10 days. After thawing the semen at 37 °C for 30 seconds, approximately 5% of the spermatozoa showed motility with vigor score of 1. It was possible to perform semen collection and cryopreservation of *Pteroplatytrygon violacea* three hours after the animal's death. The emergency protocol of transport in aquarium water from the enclosure (which activates spermatozoa) may have been the main cause of the low viability after thawing. Although preliminary, the result demonstrates potential for gamete preservation and opens perspectives for future studies and applications in species conservation programs.

Keywords: Dasyatidae, Biobank, Andrology, Reproductive Biotechnology, Dasyatidae, Biobank, Andrology, Reproductive Biotechniques, Dasyatidae, Biobank, Andrology, Reproductive Biotechnology

Legal authorizations: CEUA/Aquário de Ubatuba: nº 04/2024; CEP 11689-046. Autorização de Uso e Manejo da Espécie: nº AM2856440; SMA/SP