

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 17/08/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

***Pimelodus maculatus*: RASTREAMENTO DE
CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS E
COLETA DE SÊMEN**

Mariana Machado Evangelista

Jaboticabal, São Paulo
2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

***Pimelodus maculatus*: RASTREAMENTO DE
CÉLULAS GERMINATIVAS PRIMORDIAIS E
COLETA DE SÊMEN**

Mariana Machado Evangelista

**Orientador: Dra. Elizabeth Romagosa
Coorientador: Dr. George Shigueki Yasui**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora.

Jaboticabal, São Paulo
2018

P693p Piva, Mariana Machado Evangelista
Pimelodus maculatus : eastreamento de células germinativas primordiais e coleta de sêmen / Mariana Machado Evangelista Piva. – Jaboticabal, 2018
xi, 58 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP, 2018

Orientadora: Elizabeth Romagosa

Banca examinadora: Gisele Cristiane de Melo Dias, José Augusto Senhorini, Paulo Sérgio Monzani, Dr. Sérgio Ricardo Batlouni
Bibliografia

1. Micromanipulação. 2. Reprodução induzida. 3. Banco genético.
I. Título. II. Jaboticabal-CAUNESP.

CDU 639.3

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Jaboticabal/SP - Karina Gimenes Fernandes - CRB 8/7418



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: *Pimelodus maculatus*: rastreamento de células germinativas primordiais e coleta de sêmen

AUTORA: MARIANA MACHADO EVANGELISTA
ORIENTADORA: ELIZABETH ROMAGOSA
COORDENADOR: GEORGE SHIGUEKI YASUI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELIZABETH ROMAGOSA
Centro de Pesquisa em Peixes Ornamentais / Instituto de Pesca, IP, São Paulo-SP

Prof. Dr. JOSÉ AUGUSTO SENHORINI
/ Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais / CEPTA/ ICMBIO

Profa. Dra. GISELE CRISTIANE DE MELO DIAS
Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade de São Paulo - São Paulo/SP

Prof. Dr. PAULO SERGIO MONZANI
Departamento de Medicina Veterinária / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP

Prof. Dr. SERGIO RICARDO BATLOUNI
Laboratório de Reprodução de Peixes / Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP

Jaboticabal, 17 de agosto de 2018

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS	viii
AGRADECIMENTOS.....	ix
APOIO FINANCEIRO	xi
RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
OBJETIVOS.....	5
OBJETIVO GERAL	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
REFERÊNCIAS	6
ARTIGO 1: Primordial germ cells (PGCs) traceability in <i>Pimelodus maculatus</i>	9
ABSTRACT	10
INTRODUCTION.....	11
MATERIAL AND METHODS	12
INDUCED REPRODUCTION.....	12
EXPERIMENT 1	13
EXPERIMENT 2	14
mRNA SYNTHESIS	14
TRACEABILITY OF PRIMORDIAL GERM CELLS.....	14
STATISTIC ANALYSIS	15
RESULTS	16
EXPERIMENT 1	16
EXPERIMENT 2	19
DISCUSSION.....	23
ACKNOWLEDGEMENTS	25
BIBLIOGRAPHY.....	26
ARTIGO 2: Non-lethal procedure for collection of <i>Pimelodus maculatus</i> semen: morphology of spermatozoa and histology of testes	32
ABSTRACT	33
INTRODUCTION.....	34
MATERIAL AND METHODS	35
EXPERIMENT 1	35
SEMEN COLLECTION	35
SPERM ANALYSIS	36
EXPERIMENT 2	37

SPERM ANALYSIS	38
MICROSCOPY AND MORPHOMETRY OF SPERMATOZOA	38
STATISTICAL ANALYSIS	39
RESULTS	40
EXPERIMENT 1	40
SPERM ANALYSIS	40
EXPERIMENT 2	42
SPERM ANALYSIS	42
MORPHOMETRY OF SPERMATOZOA	45
DISCUSSION.....	49
ACKNOWLEDGEMENTS	51
REFERENCES.....	52

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figure 1.** Dechorionated eggs of *Pimelodus maculatus* in blastula stage kept in different incubation solutions. **A.** Water (with chorion). **B.** Characin. **C.** DPBS. **D-E.** Hanks. **F.** Holtfreter. **G.** MEM. **H-I.** Ringer. Arrows indicate blastomers detaching from blastoderm, arrowheads indicate deformities on the blastoderm. Bar: 250 μm18
- Figure 2.** Visualization of primordial germ cells (PGCs) in embryos and larvae of *Pimelodus maculatus* injected with GFP-*nos1* 3'UTR mRNA. **A-B.** Embryo in somite stage (10 somites) with PGCs in the medial region. **C.** Detail of the region highlighted in B. **D-E.** Embryo in somite stage (24 somites) with PGCs near the posterior extremity of the yolk extension region (arrowheads). **F.** Detail of the region highlighted in E. **G-H.** Newly hatched larvae with PGCs on the genital ridges (arrowheads). **I.** Detail of the region highlighted in H. (B, E and H are images captured under fluorescence of A, D and G, respectively). Bar: 250 μm22

ARTIGO 2

- Figure 1.** *Pimelodus maculatus* spermatozoa collected by different methods. A-B. Spermatozoa obtained by maceration of testes observed by scanning electron microscopy (A) and light microscopy (B); spermatozoa with intertwined tails are clearly seen (arrow head), fragment of tissue (thin arrow) and red blood cell (asterisk). C-D. Spermatozoa obtained by extrusion observed in scanning electron microscopy (C) and light microscopy (D). Bar = 20 μm44
- Figure 2.** *Pimelodus maculatus* spermatozoa observed by scanning electron microscopy. A. General view of the spermatozoon (thick arrow). B. Detail of head (thin arrow), middle piece (asterisk) and tail (arrow head). Bar = 3 μm46
- Figure 3.** Testes of *Pimelodus maculatus*. **A.** Anterior region with lumen full of spermatozoa (asterisk) and germ cells at previous stages of development (arrow head). **B.** Detail of anterior region, showing a spermatogonium (thin arrow), spermatocytes (arrow head), spermatids (thick arrow) and spermatozoa (asterisk). **C.** Middle region revealing lumen

with flaccid walls (thin arrow), but still full of spermatozoa (asterisk) and with germ cells at previous stages of development (arrow head). **D.** Detail of middle portion showing spermatocytes (arrow head). **E.** Posterior region with semi-depleted lumen. **F.** Detail of posterior portion, showing traces of spermatozoa (thin arrow). Bar = 50 μm48

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Table 1.** Survival rates of dechorionated eggs of *Pimelodus maculatus* kept in different solutions of incubation during embryo development, and percentage of normal and abnormal larvae.....17
- Table 2.** Survival rate of embryos of *P. maculatus* for control with chorion, control without chorion and dechorionated embryos injected with GFP-*nos1* 3'UTR mRNA during embryo development, and percentage of normal and abnormal larvae. ...21

ARTIGO 2

- Table 1: Concentration, viability, curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), straight line velocity (VSL), sperm motility (MOT), motility duration (MOT 50: 50% of immobile spermatozoa, MOT 100: 100% of immobile spermatozoa) of semen samples collected from *Pimelodus maculatus* submitted to different protocols of hormonal induction.....41
- Table 2:** Concentration, viability, curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), straight line velocity (VSL), sperm motility (MOT), motility duration (MOT 50: 50% of immobile spermatozoa, MOT 100: 100% of immobile spermatozoa) of semen samples collected from *Pimelodus. maculatus* using different methods. .43

AGRADECIMENTOS

À *Profa. Dra. Elizabeth Romagosa* pela orientação, valiosos ensinamentos, amizade, conselhos, paciência, incentivo e dedicação de sempre.

Ao *Dr. George Yasui*, pelo conhecimento transmitido e auxílio na condução dos experimentos.

Ao *Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEPTA-ICMBio)* e ao *Laboratório de Biotecnologia de Peixes*, por disponibilizar a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

À *AES Tietê Energia AS* pela concessão de bolsa de estudos (julho/2015 a fevereiro/2017) e suporte financeiro (Projeto ANEEL 4690000174).

À *CAPES* (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa de estudos (março/2017). (O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001).

À *Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho*, ao *Centro de Aquicultura da UNESP* e ao *Programa de Pós-Graduação em Aquicultura* pela infraestrutura e oportunidade. A todos os docentes e funcionários pela contribuição na minha formação profissional e por todo o auxílio.

À banca examinadora *Dra. Gisele Cristiane de Melo Dias* e *Dra. Taís da Silva Lopes*, pelas contribuições e sugestões no Exame de Qualificação.

À *Dra. Gisele Cristiane de Melo Dias*, *Dr. José Augusto Senhorini*, *Dr. Paulo Sérgio Monzani* e *Dr. Sérgio Ricardo Batlouni* por aceitarem participar da banca examinadora da Tese.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia de Peixes, em especial a *Dilberto Ribeiro Arashiro*, *Lucas Henrique Piva*, *Lucia Suárez López*, *Rafaela Manchin Bertolini* e *Nycolas Levy Pereira* pelo companheirismo, pelos momentos de alegria e descontração, pela rica troca de experiências e pelo auxílio na condução dos experimentos.

Aos funcionários da *Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEPTA-ICMBio)*, *Carlos Alberto Gaspar*, *Noel*

Martins e Ricardo Torres pelos ensinamentos e por sempre estarem dispostos a ajudar no que fosse preciso.

À minha mãe, *Maria Aparecida Machado*, e à minha avó, *Angelina Machado*, que estiveram ao meu lado em todos os momentos e não pouparam esforços para me proporcionar a melhor formação possível.

Ao meu marido *Lucas Henrique Piva* pelo amor, apoio e companheirismo incondicionais, essenciais para a condução e conclusão desse trabalho. À nossa amada filha *Luana*, que já se faz presente em todos os instantes.

Aos meus sogros *Inês Elisabete Meneghin Piva e Luís Antonio Piva* pelo carinho e incentivo de sempre.

A todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

APOIO FINANCEIRO

AES Tietê Energia SA: Bolsa de Doutorado (julho/2015 a fevereiro/2017) e suporte financeiro (Projeto ANEEL 4690000174)

CAPES-DS: Bolsa de Doutorado (março/2017)

RESUMO

Nos últimos anos, *Pimelodus maculatus* vem sendo utilizado como espécie modelo para o desenvolvimento de técnicas de biotecnologia em Siluriformes. Neste estudo foram abordados aspectos da micromanipulação de embriões e obtenção de espermatozoides de *P. maculatus*. Assim, o objetivo do artigo 1 foi identificar e rastrear a rota migratória das Células Germinativa Primordiais (PGCs) em *P. maculatus*. Inicialmente, foram testadas soluções para incubação de embriões decorionados, e a solução de Characin apresentou resultados satisfatórios. Para identificar as PGCs, os embriões decorionados foram microinjetados com mRNA 3'UTR GFP-*nos1*, e o desenvolvimento foi monitorado em estereomicroscópio de fluorescência. Inicialmente, as PGCs foram visualizadas no estágio 6-10 somitos na região medial do embrião. Posteriormente, as PGCs migraram gradativamente na direção anteroposterior e, no estágio 20-24 somitos, localizaram-se próximo à extremidade posterior da região de extensão do vitelo. Nas larvas recém-eclodidas, as PGCs foram encontradas nas cristas genitais. No artigo 2, foi estabelecida uma metodologia não letal para obtenção de espermatozoides de *P. maculatus*, e também descritos aspectos da morfologia dos espermatozoides e da histologia dos testículos. No experimento 1, avaliamos os parâmetros espermáticos de amostras obtidas de peixes submetidos a diferentes protocolos de indução: 1) Solução Fisiológica Salina (controle), 2) Extrato Bruto de Hipófise de Carpa (CCPE) 10 mg kg⁻¹ e 3) CCPE 10 mg kg⁻¹ + ocitocina 5 UI kg⁻¹. O protocolo que apresentou melhores resultados foi a indução com CCPE 10 mg kg⁻¹, e no experimento 2 foi comparado ao procedimento de indução hormonal seguido de maceração dos testículos. Neste experimento, não houve diferença entre esses procedimentos quanto aos parâmetros avaliados, o que indicou que a indução com 10 mg kg⁻¹ de CCPE pode ser satisfatoriamente utilizada para a obtenção do sêmen de *P. maculatus* sem a necessidade de sacrificar os machos para remoção dos testículos. Com relação à morfologia, *P. maculatus* exibiu espermatozóides do tipo *aquasperms*, com características típicas de espécies com fertilização externa. A análise histológica dos testículos revelou diferenças entre as regiões anterior e posterior, onde a primeira mostrou atividade espermatogênica, enquanto a segunda apresentou atividade secretora.

ABSTRACT

In the last few years, *Pimelodus maculatus* has been used as a model species for the development of biotechnology techniques in Siluriformes. In this study were covered aspects of embryo micromanipulation and obtainment of sperm cells of *P. maculatus*. Thus, the aim of article 1 was to identify and trace the migratory route of Primordial Germ Cells (PGCs) in *P. maculatus*. Initially, it was made a screening of solutions for incubation of dechorionated embryos, and Characin solution showed satisfactory results. To identify the PGCs, dechorionated embryos were microinjected with GFP-*nos1* 3'UTR mRNA, and development was monitored in fluorescence stereomicroscope. Initially, PGCs were visualized at 6-10 somites stage in the medial region of the embryo. Later, PGCs migrated gradually in anteroposterior direction, and in the 20-24 somites stage, were located near the posterior extremity of the yolk extension region. In newly hatched larvae, PGCs were found in the genital ridges. In article 2, we have established a non-lethal methodology to obtain sperm cells from *P. maculatus*, and have also described aspects of spermatozoa morphology and histology of testes. In experiment 1, we assessed the sperm parameters of samples obtained from fish submitted to different induction protocols: 1) Physiological Saline (control), 2) Crude Carp Pituitary Extract (CCPE) 10 mg kg⁻¹ and 3) CCPE 10 mg kg⁻¹ + Oxytocin 5 UI kg⁻¹. The protocol that showed the best results was induction with CCPE 10 mg kg⁻¹, and in experiment 2 it was compared to the procedure of hormonal induction followed by testes maceration. In this experiment, there was no difference between such procedures concerning the parameters evaluated, which indicated that induction with CCPE 10 mg kg⁻¹ may be satisfactorily used to obtain semen from *P. maculatus* without having to kill the fish for testes removal. With regard to its morphology, *P. maculatus* exhibited aquasperm spermatozoa, with some typical characteristics of species with external fertilization. Histological analysis of the testes revealed differences between the anterior and posterior regions, where the former showed spermatogenic activity, while the latter showed secretory activity.

INTRODUÇÃO GERAL

A Ordem Siluriformes é composta por 40 famílias, 490 gêneros e conta com cerca de 3.730 espécies, destas 2.053 se encontram distribuídas ao longo de todo continente americano, predominantemente em água doce [1]. No Brasil, esta Ordem é a segunda mais diversa em relação ao número de espécies de água doce, precedida apenas pelos Characiformes [2]. Além disso, das 353 espécies de Actinopterygii brasileiros ameaçados de extinção 91 são Siluriformes, fazendo desta a segunda Ordem mais ameaçada no Brasil [3]. Tamanha representatividade enfatiza a necessidade de avanços visando buscar informações básicas sobre a biologia das espécies desse grupo, bem como desenvolver técnicas que possam ser utilizadas como ferramentas para conservação. Nesse sentido, é estratégica a utilização de espécies-modelo para alavancar o desenvolvimento de tais tecnologias e, nos últimos anos, *Pimelodus maculatus* vem sendo utilizado como espécie-modelo para Siluriformes no Brasil.

Pimelodus maculatus é popularmente conhecido como mandi, mandi amarelo ou mandi pintado [4], encontra-se amplamente distribuído nas bacias sul-americanas dos Rios Paraná e São Francisco [5], onde realizam migrações de curta distância [6]. Peixes dessa espécie são dioicos, podendo atingir cerca de 50 cm de comprimento, e 2 kg de peso [7]. Economicamente, a importância dessa espécie reside no contexto da pesca artesanal [8,9], além de escassos registros de produção em cativeiro [10]. Independentemente do fim a que se destina o cultivo de exemplares dessa espécie em cativeiro, seja para produção comercial ou manutenção de planteis para pesquisas, é fato que o domínio de técnicas que permitam controlar a reprodução é essencial [11].

Em ambiente natural a reprodução de *P. maculatus* coincide com os meses chuvosos e de temperatura elevada, compreendidos entre novembro e janeiro [12,13]. Ao longo desse período ocorre desova parcelada, com maturação dos oócitos em diferentes grupos [12]. Os ovos produzidos são não-aderentes e de cor amarelada [14] com diâmetro pós-hidratação de $1838.15 \pm 61.53 \mu\text{m}$ e espaço perivitelínico de $323.71 \pm 44.28 \mu\text{m}$ [15]. Em cativeiro, ainda com a utilização da técnica de indução hormonal, a desova não ocorre espontaneamente, sendo necessária massagem abdominal para

liberação dos oócitos [16] e observada fecundidade relativa média de $132,325.00 \pm 24,660.00$ ovos.kg fêmea⁻¹ [15].

No caso dos machos a limitação da reprodução em cativeiro é ainda maior, dado que a indução hormonal seguida de massagem abdominal não garante volume suficiente de sêmen para realização da fertilização *in vitro*, isso pode ser relacionado à morfologia dos testículos nessa espécie, que tem como peculiaridade a presença de projeções digitiformes (“franjas”) [17]. Assim, para a realização da reprodução é comumente utilizada a remoção e maceração dos testículos [18], o que não representa uma prática sustentável. Dessa forma, o desenvolvimento de uma metodologia que permita a obtenção de células espermáticas sem que seja necessário o sacrifício de machos faz-se necessária, ainda mais dentro do contexto de utilização de *P. maculatus* como espécie modelo em estudos de conservação.

Dentre tais trabalhos de conservação tem ganhado destaque aqueles envolvidos na utilização de *P. maculatus* como receptor de células germinativas de espécies de Siluriformes ameaçadas de extinção para produção de quimeras. Nesse sentido, o primeiro passo foi o estudo de aspectos do desenvolvimento embrionário da espécie visando a determinação da temperatura mais adequada, bem como os intervalos de duração das diferentes fases [19]. Posteriormente foi elaborado protocolo para triploidização de embriões de *P. maculatus* e confirmada a efetividade da triploidização na produção de peixes estéreis [20]. Peixes adultos estéreis também já foram utilizados em experimentos como receptores de oogônias e espermatogônias de *Pseudopimelodus mangurus* [21]. No contexto de tais estudos, o próximo passo consiste na micromanipulação de embriões para transferência de células germinativas primordiais (PGCs), o que envolve no primeiro momento a determinação da solução ideal para cultivo de embriões decorionados, além da identificação das PGCs e rastreamento da rota migratória. Uma vez que a rota migratória original é conhecida, é possível compará-la com as de PGCs transplantadas, e assim verificar se estas seguem o mesmo padrão.

REFERÊNCIAS

- [1] S. Nelson J, Grande T, Wilson M. Fishes of the World, Fifth Edition. 2016.
- [2] Rosa RS, Lima FCT. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção 2008;2:1–278.
- [3] Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Sumário Executivo-Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção 2016.
- [4] Buzollo H, Veríssimo-Silveira R, Oliveira-Almeida IR, Alexandre JS, Okuda HT, Ninhaus-Silveira A. Structural analysis of the *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803) embryogenesis (Siluriformes: Pimelodidae). Neotrop Ichthyol 2011;9:601–16.
- [5] Lundberg J, Littmann M. Family Pimelodidae. In: Reis R, Kullander S, Ferraris C, editors. Checkl. Freshw. Fishes South Cent. Am., Porto Alegre: EDIPUCRS; 2003, p. 432–47.
- [6] Agostinho AA, Gomes LC, Suzuki HI, Julio Jr HF. Migratory fishes of the upper Paraná River basin, Brazil. Migr Fishes South Am Biol Fish Conserv Status 2003:19.
- [7] Sato Y, Fenerich-Verani N, Verani JR, Godinho HP, Sampaio EV. Reproductive traits of the yellow-mandi catfish *Pimelodus maculatus* Lacépède (Osteichthyes, Siluriformes) in captive breeding. Rev Bras Zool 1999;16:981–6.
- [8] Peixer J, Petrere Junior M. Socio-economic characteristics of the Cachoeira de Emas small-scale fishery in Mogi-Guaçu River, State of São Paulo, Brazil. Brazilian J Biol 2009;69:1047–58.

- [9] Costa RS, Okada EK, Agostinho AA, Gomes LC. Variação temporal no rendimento e composição específica da pesca artesanal do alto rio Paraná, PR–Brasil: Os efeitos crônicos dos barramentos. *Bol Do Inst Pesca* 2012;38:199–213.
- [10] Baldisserotto B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. *Ciência Rural* 2008;39.
- [11] Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen Comp Endocrinol* 2010;165:516–34.
- [12] Bazzoli N, Cangussu LCV, Rizzo E, Santos GB. Reprodução e desova de mandis *Pimelodus maculatus* e *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) nos reservatórios de Furnas, Marimbondo e Itumbiara. *Bios* 1997;5:7–15.
- [13] Leonardo AFG, Romagosa E, Borella MI, Batlouni SR. Induced spawning of hatchery-raised Brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). *Aquaculture* 2004;240:451–61.
- [14] Sato Y. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. *Águas, Peixes e Pescadores do São Francisco das Minas Gerais* 2003:229–74.
- [15] Arantes FP, Borçato FL, Sato Y, Rizzo E, Bazzoli N. Reproduction and embryogenesis of the mandi-amarelo catfish, *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae), in captivity. *Anat Histol Embryol* 2013;42:30–9.
- [16] Cruz RJG, Santos JE dos. Testicular structure of three species of neotropical freshwater pimelodids (Pisces, Pimelodidae). *Rev Bras Zool* 2004;21:267–71.
- [17] Damasceno DZ, Krause RA, Adames MS, Neumann G, Gibathe A, Bombardelli RA, et al. Induced spermiation of *Pimelodus britskii* (Teleostei: Pimelodidae)

during the reproductive period. *Aquac Res* 2015;48:862–74.

- [18] Arashiro DR, Yasui GS, Calado LL, Pereira-Santos M, Levy-Pereira N, Monzani PS, et al. Synchronizing developmental stages in Neotropical catfishes for application in germ cell transplantation 2018.

- [19] Bertolini, RM. Crescimento e aspectos reprodutivos de *Pimelodus maculatus* triploides. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2018.

- [20] Lopez LS. Transplante interespecífico de células germinativas-tronco em Siluriformes neotropicais. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2018.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos nos dois artigos aqui apresentados foi possível obter avanços no que diz respeito ao desenvolvimento de estudos de conservação com *Pimelodus maculatus*, espécie que vem sendo utilizada como modelo experimental para peixes Siluriformes. No artigo 1 foi estabelecida uma solução de manutenção para embriões decorionados de *P. maculatus*, além de visualizada a rota de migração das células germinativas primordiais (PGCs). Tais informações são de fundamental importância para utilização em futuros trabalhos que envolvam a micromanipulação de embriões de Siluriformes e formação de bancos genéticos.

Por outro lado, no artigo 2 foi estabelecida uma metodologia para a obtenção de células espermáticas de *P. maculatus* sem que haja a necessidade de sacrificar os machos. Assim, tal procedimento torna mais viável a realização da fertilização *in vitro* nessa espécie, que comumente é utilizada em trabalhos de biotecnologia que envolvem a manipulação de gametas e embriões, bem como acompanhamento do desenvolvimento embrionário.