

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 14/02/2015.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA (CAUNESP)

São Paulo State University-Aquaculture Center



Aspectos reprodutivos, morfologia dos gametas e desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae)

Matheus Pereira dos Santos

Zootecnista

Orientadora: Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi

Co-orientador: Dr. George Shigueki Yasui

Dissertação apresentada ao programa de Pós – graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

**Jaboticabal
São Paulo, Brasil
2014**

Santos, Matheus Pereira dos
S237a Aspectos reprodutivos, morfologia dos gametas e desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) / Matheus Pereira dos Santos. -- Jaboticabal, 2014
x, 80 p. : il. ; 28.cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2014
Orientadora: Laura Satiko Okada Nakaghi
Banca examinadora: José Augusto Senhorini, Carlos Alberto Vicentini
Bibliografia

1. *Astyanax altiparanae*. 2. Morfologia. 3. Embriogênese. I. Título.
II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.034

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
REITORIA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Aspectos reprodutivos, morfologia dos gametas e desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae)

AUTOR: MATHEUS PEREIRA DOS SANTOS

ORIENTADORA: Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. GEORGE SHIGUEKI YASUI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Aqüicultura , pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. CARLOS ALBERTO VICENTINI
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências de Bauru



Prof. Dr. JOSE AUGUSTO SENHORINI
/ Instituto Chico Mendes de Conservação Da Biodiversidade

Data da realização: 14 de fevereiro de 2014.

Agradecimentos

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos os colaboradores, amigos e familiares que, de certa forma, em muito contribuíram na minha formação pessoal e profissional ao longo da trajetória deste trabalho. Em especial:

A minha família, fundamental do principio a conclusão da minha pesquisa.

À professora Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi, pela oportunidade em me confiar uma pesquisa na pós – graduação, e por todos os seus valiosos conselhos e conhecimentos.

Ao Dr. George Shigueki Yasui, pela confiança em realizar este trabalho em parceria desde o início, sempre presente em cada etapa do trabalho, contribuindo com sua experiência e valiosos conhecimentos.

Ao Dr. José Augusto Senhorini, pelos conselhos e ajuda durante todo meu curso de mestrado, pela participação em minha qualificação e defesa e pela recepção e atenção dedicadas durante toda minha estadia no CEPTA/ICMBio. Muito obrigado por tudo.

A FAPESP (processo 2012/18961-4), pelo suporte financeiro fornecido no decorrer do desenvolvimento das etapas deste trabalho.

A amiga Juliana Fernandes, por me acompanhar desde a graduação, estando sempre presente desde então.

Aos amigos e companheiros de Pirassununga, Elayna Cristina Maciel, Isabella Rocha Menezes, Nadya Soares de Macedo Adamov, Pedro Luiz Porfirio Xavier, Tamiris Disseli, Isaac Yo, Isabella Malachias Gaspar, Rafaela Manchin Bertolini, Paulo André Andrade Santos, Lucas Piva, Letícia Dragone, Letícia Freitas, Matheus Tonetti, William Oliveira, por todo auxílio e companhia durante a execução da pesquisa, tornando-se muito importantes durante esta jornada.

Aos amigos e colegas de laboratório de Jaboticabal, Nivaldo Ferreira do Nascimento, Lílian Cristina Makino, Francine Faustino, Márcio Alves, Breno Manzini, Letícia Hayashi Higuchi, Adriana Cristina Bordignon, Maria do Carmo Faria Paes, Fernanda Nogueira Valentin e Regiane Silva.

Ao Centro de Conservação de Peixes Continentais, CEPTA/ICMBio, em Pirassununga, pelo fornecimento de todo suporte necessário referente à instalações e fornecimento de material biológico, especialmente a todos os funcionários e pesquisadores que representam esta importante instituição.

A Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal e ao Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP) pelo apoio institucional.

A Universidade de São Paulo (USP), Campus de Ribeirão Preto e Pirassununga, pelo fornecimento de instalações e equipamentos necessários para subsidiar diversas etapas desta pesquisa.

Pereira-Santos, Matheus (2014). Aspectos reprodutivos, morfologia dos gametas e desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae). Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

Resumo Geral

O objetivo deste trabalho foi estudar aspectos básicos dos gametas e o desenvolvimento inicial de *Astyanax altiparanae*, para futura aplicação na área de biotecnologia, incluindo manipulação cromossômica de embriões. No Capítulo I, os ovócitos foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e a dose inseminante foi determinada. O sêmen também foi coletado e analisado com sistema de análise computadorizada (CASA). A dose inseminante reduzida encontrada para a espécie foi explicada pela morfologia dos ovócitos através de análise em MEV, que revelou vilosidades que cercam a micrópila relacionadas à orientação do esperma para a fecundação. No capítulo II, vários parâmetros relacionados com a fertilização foram descritos, incluindo a extrusão do segundo corpúsculo polar, a fusão dos pronúcleos e a formação do cone de fertilização. Além disso, o efeito de três temperaturas (22°C, 26°C e 30°C) sobre os estádios de desenvolvimento foi determinado. A extrusão do segundo corpúsculo polar ocorreu em 4-6 minutos pós-fertilização (mpf), e os pronúcleos fundiram-se com 8-10 mpf. O espermatozoide apresentou uma cabeça esférica, peça intermediária e flagelo. Como esperado, as temperaturas mais elevadas deram origem a um desenvolvimento e incubação mais rápidos. As informações obtidas neste estudo irão abrir novas possibilidades no campo da manipulação cromossômica de embriões, incluindo poliploidia, quimerismo, transgenia e outras técnicas.

Palavras – chave: *Astyanax*, embriogênese, fertilização, gametas, morfologia.

Pereira-Santos, Matheus (2014). Reproductive aspects, morphology of gametes and embryonic development of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae). Master Thesis (Master Degree in Aquaculture) – Aquaculture Center of São Paulo State University, Jaboticabal, SP.

General Abstract

The aim of this study was to study basic aspects of gametes and early development of yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*, for future application in biotechnology including chromosome and embryo manipulation. In Chapter I, the oocytes were analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM) and the insemination dose was determined. Semen was also collected and analyzed using a Computer Assisted Sperm Analysis (CASA). Such a reduced inseminating dose was explained by oocyte morphology because SEM analysis revealed villosities surrounding the micropyle that is related to the sperm guidance for fertilization. In addition, the duration of sperm motility was longer in comparison to most teleosts, what may improve fertilization ability. In Chapter II, several parameters related with fertilization were described, including the second polar body extrusion, fusion of the pronuclei and the formation of the fertilization cone. Moreover, the effect of three temperatures (22°C, 26°C and 30°C) on developmental stages was determined. 2nd polar body was extruded at 4-6 minutes post fertilization (mpf), and the pronuclei were formed at 8-10 mpf. The sperm showed a spherical head, midpiece and flagellum. As expected, higher temperatures gave rise to faster development and hatching. The information obtained in this study will open new possibilities in the field of chromosome and embryo manipulation including poliploidy, chimerism, transgenesis and other techniques.

Keywords: *Astyanax*, embryogenesis, fertilization, gametes, morphology.

Introdução Geral

O setor de produção de pescado e seus derivados ganhou projeção nos últimos anos no comércio nacional, devido, principalmente, ao interesse pelo mercado consumidor por produtos de alto valor nutritivo agregado e aspectos saudáveis. No entanto, o consumo de pescado no Brasil ainda é muito inferior à média mundial, mesmo com todo o potencial nacional para produção de peixes devido ao clima, disponibilidade de água e espécies com potencial de cultivo.

Visando consolidar a produção e subsequente consumo de pescado, foi criado o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) e a entrada em vigor da lei 11.959/09, que regulamenta a atividade, a partir de 2009, o setor aquícola nacional ampliou o potencial de crescimento de sua cadeia produtiva de pescado. Esta impulsão ajudou a melhorar o cenário histórico de baixa produtividade e aproveitamento do litoral, rios e lagos nacionais. Mesmo com essas mudanças, e aliado a todo o seu potencial de produção, o país ocupou apenas a 17^a colocação entre os maiores produtores de pescado do mundo naquele ano (FAO, 2009).

Em 2010, a produção nacional chegou a 1.264.764,9 toneladas de pescado, apresentando um incremento de 2% comparado ao ano anterior. Neste percentual, a produção de lambari, nome comum para as espécies do gênero *Astyanax*, foi de 1.097,9 toneladas (BOLETIM ESTATÍSTICO DA PESCA E AQUICULTURA, 2012), representando menos de 1% do total produzido. No entanto, a produção de lambaris apresenta grande potencial para a aquicultura e indústria de enlatados (BRITSKI, 2004).

Em seus ecossistemas naturais, incluindo os rios da América do Sul, desempenham importante papel ecológico como fonte de alimentação, com participação significativa na cadeia alimentar da ictiofauna (AGOSTINHO e GOMES, 1997).

Dentre as espécies de lambaris, destaca-se o lambari – do – rabo – amarelo, por seu crescimento e rusticidade. Este caracádeo é amplamente distribuído pela bacia do rio Paraná, no Brasil, onde foi inicialmente identificada como *Astyanax bimaculatus*, sendo posteriormente revista e descrita por Garutti e Britski (2000). A espécie também é encontrada entre a ictiofauna do rio Iguaçu, também no Brasil, assim como outras espécies do gênero *Astyanax*. O gênero apresenta grande variedade cariotípica, com um número de cromossomos variando de $2n = 36$ (*A. shubarti*) a $2n = 50$ (*A. bimaculatus*, *A. scabripinis*, *A. altiparanae*), o que torna complexa a sua classificação citotaxonômica (MORELLI *et al.*, 1983).

Lobón-Cerviá e Bennemann (2000) e Andrian *et al.* (2001) relatam em seus estudos que a espécie apresenta grande capacidade de adaptação aos mais variados tipos de dietas provenientes do seu ecossistema natural, em decorrência de fatores ambientais que possam provocar falta de alimentos ou acúmulo de outras fontes. Devido à esta plasticidade alimentar, a espécie pode ser classificada como oportunista, uma vez que apresenta variações na sua dieta que são condicionadas por fatores de sazonalidade e espacialidade, sendo predominantemente onívora.

Esta característica de facilidade em adaptar sua dieta às condições do ambiente aquático facilita ainda mais sua adaptação, potencializando a expansão e crescimento da espécie. Outros aspectos ligados à sua reprodução também facilitam a perpetuação em ambientes diversificados, a destacar a alta taxa de fecundidade que apresentam, além do fato de possuírem ovos pequenos com rápido desenvolvimento (AGOSTINHO *et al.*, 1999), e proteção parental passiva (desovam em substratos como raízes de plantas e longe dos predadores).

Quanto aos seus aspectos reprodutivos, as fêmeas desta espécie têm sua primeira maturação sexual próximo de 69,00 mm CT, com período de reprodução geralmente se estendendo de setembro a março. Sua desova é parcelada e a fecundação é externa, apresentando cuidado passivo com a prole e realizando pequenas migrações na natureza. A desova da espécie possui picos que são diretamente influenciados pela temperatura da água e índices de chuva (NAKATANI *et al.*, 2001).

O gênero apresenta estratégia reprodutiva do tipo sedentária, com ovos adesivos e zona radiata apresentando canais porosos (RIZZO *et al.*, 2002). Carvalho *et al.* (2009) destacam os seguintes estágios de maturação gonadal para machos e fêmeas da espécie *Astyanax fasciatus*, baseados em características morfológicas, distribuição do ovócito e células espermatogênicas: repouso, maduro inicial, maduro, parcialmente vazio e totalmente vazio. A maior frequência de machos e fêmeas que se apresentam em estágio maduro ocorre entre os meses de outubro a março.

Os autores destacam ainda que o prolongado período reprodutivo, associado à frequência constante de fêmeas em estágio maduro durante todo o ano são aspectos que confirmam a característica de desova fracionada apresentada pelo gênero.

Garutti (1989) relata que, em exemplares da espécie *Astyanax altiparanae* observados na bacia do rio Paraná, pode ocorrer diferentes comportamentos reprodutivos que são condicionados pelo ambiente. O estudo aponta desova fracionada

no curso do rio e total nas regiões de estuário, evidenciando dois aspectos reprodutivos diferentes verificados para a mesma espécie.

Quanto à estrutura gonadal, as espécies do gênero apresentam ovários do tipo cistovariano, onde o lume ovariano se estende até o oviduto. As gônadas representam órgãos pares, alongados e foliáceos, sofrendo modificações na espessura, volume e coloração durante as diferentes fases do ciclo reprodutivo (NAGAHAMA, 1983; MELO *et al.*, 2005). O tipo de desenvolvimento ovocitário é assincrônico, com presença de ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (PEREIRA FILHO, 2000).

Nos machos, o testículo está localizado nos dois lados da cavidade abdominal, estendendo-se da porção cefálica até a caudal, onde se conecta ao poro genital. A espécie *Astyanax altiparanae* apresenta testículo do tipo tubular anastomosado com porções responsáveis pela espermatogênese e secreção (COSTA, 2011).

A espermatogênese da espécie possui finalização na luz do túbulo e não no interior dos cistos, além de diferentes padrões de condensação da cromatina, sendo classificada, por estes aspectos, como semicística (MATTEI *et al.*, 1993; COSTA, 2011).

Devido a vários aspectos de sua biologia e morfologia (maturação sexual precoce, tamanho reduzido e desova intermitente), a espécie torna-se um interessante modelo em estudos com espécies nativas.

A adoção de espécies experimentais é estratégica para o desenvolvimento de tecnologias potencialmente aplicáveis na produção do lambari, bem como de outras espécies. Contudo, não existe ainda um modelo experimental na região Neotropical. No caso do lambari *A. altiparanae*, ainda devem ser elucidados vários aspectos da biologia básica para aplicação futura em estudos mais avançados, como a produção de peixes triploides estéreis.

1. Biotecnologia aplicada à produção de peixes triploides na aquicultura

A poliploidia é uma ferramenta aplicada da biotecnologia que se apresenta como uma alternativa promissora ao incremento na produção de alimentos oriundos da aquicultura, além de ser também uma opção vantajosa na produção de organismos estéreis.

Por definição, a poliploidia refere-se a um estado genético de incremento no conjunto de cromossomos, que pode ocorrer eventualmente na natureza, apesar de mais

raro, ou ser induzida por métodos artificiais, físicos ou químicos, em organismos aquáticos por meio da manipulação dos embriões em eventos determinados da sua embriogênese (DUNHAM, 2004, PIFERRER et al., 2009). Entre os poliploides, destacam-se os organismos triploides, que possuem três conjuntos de cromossomos, e os tetraploides, indivíduos que possuem quatro conjuntos de cromossomos e que diferem então do estado normal diploide (DUNHAM, 2004).

Entre os organismos aquáticos, principalmente peixes e mariscos, os triploides apresentam-se viáveis e geralmente tendem a esterilidade, devido à limitação do desenvolvimento gonadal, o que permite melhor aproveitamento da energia em crescimento somático. No entanto, entre algumas espécies de teleósteos, os triploides podem ser férteis (DUNHAM, 2004; FUJIMOTO, 2010).

Desta forma, uma vez estabelecido o protocolo de indução à triploidia em determinada espécie e comprovada a sua esterilidade por meio de análise do desenvolvimento gonadal, a utilização de triploides na aquicultura nacional pode ser vantajosa em casos em que os esforços reprodutivos da espécie comprometam os índices de crescimento, sobrevivência ou até mesmo qualidade do produto final (SHATKIN et al., 1997). Os triploides estéreis podem também ser empregados em outras tecnologias como o quimerismo, atuando como receptores de células germinativas, garantindo a produção de gametas a partir das células do doador.

O estabelecimento da produção massal de peixes poliploides pode contribuir com um viés econômico e de preservação da fauna aquática nacional. Além destas vantagens, o uso de triploides estéreis na aquicultura pode ajudar a proteger a diversidade genética das populações nativas e impedir o estabelecimento de populações que eventualmente escapem dos ambientes de criação nos sistemas naturais.

Este é um aspecto relevante em resposta às preocupações sobre o uso de organismos transgênicos na indústria e um potencial risco de falta de controle destes organismos quando entrarem em contato com reprodutores selvagens (SELLARS *et al.*, 2006; RASMUSSEN e MORRISSEY, 2007).

No entanto, a cadeia de produção de organismos triploides na aquicultura deve ser bem consolidada e com alto grau de eficácia. Para solucionar este problema, uma alternativa seria produzir os organismos triploides através do acasalamento de indivíduos tetraploides e diploides. Os organismos tetraploides são produzidos artificialmente da mesma forma que os triploides, mas a interferência ocorre em um

momento distinto da embriogênese, durante a primeira clivagem do embrião (RASMUSSEN e MORRISSEY, 2007).

Quanto aos aspectos relacionados ao bem-estar, estudos reportam que peixes triploides são consideravelmente mais suscetíveis aos fatores de estresse quando comparados aos diploides, sob as mesmas condições de criação. Neste sentido, deve ser dada atenção maior quanto à adoção de práticas menos estressantes em sistemas de criação, para que não se comprometam os índices de produção e mesmo de manutenção destes animais em condições experimentais (JUNGALWALLA, 1991; OJOLICK *et al.*, 1995). No entanto, são escassos os trabalhos que comprovem uma influência negativa em índices de sobrevivência e crescimento de animais triploides em decorrência de estresse e mal estar. Os estudos que comparam os índices de crescimento somático entre diploides e triploides da mesma espécie também são escassos (PIFERRER *et al.*, 2009; FRASER *et al.*, 2012). Estudos prévios apontam uma tendência geral de crescimento reduzido dos triploides comparados aos diploides nas fases iniciais de vida, mas similar nas fases posteriores, após a primeira alimentação (FRASER *et al.*, 2012).

A Tabela 1 apresenta, de forma comparativa, características relacionadas à produção em espécies de peixes com potencial para aquicultura. A incidência destas características relatadas são, na maioria, favoráveis aos triploides (T) em relação aos diploides (D). Estes trabalhos, no entanto, são praticamente inexistentes e inconclusivos para as espécies nativas com potencial produtivo em cadeia nacional.

Tabela 1: Aspectos relacionados a produção em espécies de peixes com potencial produtivo submetidos a triploidia (T) e comparados com os diploides (D) da mesma espécie.

Característica	Espécie	Comparação Incidência	Referência
Agressividade	Salmão do Atlântico	Igual	O' Keefe e Benfey (1997)
		T < D	Carter <i>et al.</i> (1994)
	Salmão real	T < D	Garner <i>et al.</i> (2008)
	Truta arco-íris	T < D	Wagner <i>et al.</i> (2006)
	Truta	Igual T < D	Wagner <i>et al.</i> (2006) O' Keefe e Benfey (1997)
Consumo de Alimento	Peixe de briga siamês	T < D	Kavumpurath e Pandian (1992)
	Salmão do Atlântico	Igual	Carter <i>et al.</i> (1994)
	Truta arco-íris	T < D T < D	Carter <i>et al.</i> (1994) Kobayashi e Fushiki (1997)
Crescimento	Truta arco-íris	Igual	Koenig <i>et al.</i> (2011)
		Igual	Koenig e Mayer (2011)
Sobrevivência	<i>Salvelinus fortinalis</i> Truta arco-íris	Igual	Benfey <i>et al.</i> (1997)
		Igual	Galbreath <i>et al.</i> (2006)

Adaptado de Fraser *et al.* (2012).

Em contrapartida, alguns autores relatam que para espécies de salmonídeos e esturjões, os indivíduos triploides executam de forma semelhante respostas a fatores de estresse sob condições de confinamento, sem alterações de bem-estar que possam prejudicar o desempenho e sobrevivência dos triploides (BIRON e BENFEY, 1994; BENFEY e BIRON, 2000).

Estes estudos devem ser conduzidos em espécies nativas de peixes, a fim de se analisar de forma comparativa os aspectos relacionados ao bem-estar destes animais.

Protocolos de indução e produção de indivíduos triploides também não foram bem estabelecidos para as espécies neotropicais nativas, bem como a constatação da esterilidade nas espécies observadas.

Uma das etapas da presente pesquisa é justamente estabelecer um protocolo de indução à triploidia em uma espécie nativa por meio de choques físicos. O trabalho trará subsídios para futuros estudos sobre a esterilidade, desenvolvimento, sobrevivência e utilização na biotecnologia aplicada à aquicultura.

Considerações Finais

O trabalho apresentado é resultado de um estudo detalhado a cerca de eventos e aspectos relacionados à biologia da espécie *Astyanax altiparanae*. Cada etapa desta pesquisa foi realizada de forma fundamentada, contextualizada a fim de gerar subsídios para novas investigações.

As futuras direções que evoluem a partir desta pesquisa são claras, sendo algumas delas já desenvolvidas com base nos dados aqui gerados. Entre um dos principais objetivos do trabalho, como apontado na introdução geral, foi reunir informações sobre a espécie que possibilitassem a criação de um protocolo de indução de indivíduos poliploides. A padronização desta técnica irá possibilitar o avanço em pesquisas relacionadas à biotecnologia e manipulação cromossômica em peixes.

Para que seja possível a padronização de um protocolo eficiente de indução de indivíduos triploides e tetraploides, são necessárias informações referentes aos eventos pós – fertilização da espécie: a extrusão do segundo corpúsculo polar e a fusão dos pronúcleos. A presente pesquisa trouxe essas informações e deu subsídios para a padronização de um protocolo eficaz de indução de indivíduos triploides.

Em trabalhos desenvolvidos em conjunto pelo grupo de pesquisa, estabeleceu-se um método de indução de indivíduos $3n$ da espécie a partir de choque físico de temperatura com 90% de eficácia. Detalhes como momento de choque e intervalos de duração foram padronizados com base nos resultados da presente pesquisa, na forma de um trabalho de conclusão de curso, e uma dissertação de mestrado está sendo conduzida a partir desse protocolo de triploidização. Novos estudos estão sendo executados com objetivo de padronizar, também, protocolos de indução de tetraploides na espécie.

A descrição do desenvolvimento embrionário sob diferentes temperaturas de incubação poderá ser base no avanço de trabalhos relacionados a transplante celular entre espécies nativas. Na biotecnologia, para que espécies doadoras possam transmitir células germinativas para receptoras, a embriogênese de ambas deve ser bem conhecida, para que seja possível estabelecer uma certa sincronia nos estágios do desenvolvimento em que é feito o transplante.

Este trabalho pode enriquecer diversas áreas da aquicultura nacional e internacional. Uma vez estabelecidas as etapas iniciais, o transplante celular pode ser utilizado como ferramenta, mesmo que a longo prazo, de preservação de espécies ameaçadas. Espécies que possuem ampla distribuição, biologia conhecida e fácil reprodução, como o lambari-do-rabo-amarelo, podem ser receptoras em potencial de

células germinativas de outras espécies, que podem estar em extinção ou mesmo que tenham interesse para produção no setor.

Diante deste panorama, os dados gerados pelo presente trabalho, além de serem inéditos para a espécie, estão inseridos como etapa primordial desta pesquisa, e possuem uma aplicação prática para o prosseguimento de novos estudos.

A execução do projeto ocorreu, principalmente, entre duas instituições, o Centro de Aquicultura da Unesp, em Jaboticabal, e o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, em Pirassununga. Além destas instituições, foi possível realizar parcerias entre mais duas universidades (USP, Campus de Ribeirão Preto, onde foi feito o processamento em microscopia eletrônica de varredura e USP, Campus de Pirassununga, onde foi realizada a microscopia com fluorescência e a análise computadorizada do sêmen), a fim de dar prosseguimento ao processamento e enriquecimento dos dados gerados. O aprendizado gerado foi muito positivo, contribuindo para o amadurecimento profissional e o crescimento como pesquisador.

As metodologias executadas, os resultados obtidos e a experiência de trabalho dão suporte e embasamento para o desenvolvimento de novas pesquisas durante o doutorado. Também houve inserção na ciência, através da publicação e participação em reuniões científicas, trazendo informações inéditas sobre biotecnologias aplicadas a espécies nativas, inseridas na ictiofauna nacional.