

# Diversidade Genética de Populações e Criopreservação de Sêmen de Pirapitinga-do-Sul *Brycon opalinus*

Laura H. Orfão, Ana T.M. Viveiros, Alexandre W.S. Hilsdorf, Danilo Caneppele

**Resumo** – A espécie pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* é endêmica do Rio Paraíba do Sul e vêm sofrendo com as alterações ambientais causadas pela ocupação humana. Este trabalho apresenta um estudo da diversidade genética e o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação do sêmen da pirapitinga-do-sul. Através da análise de sequências da região controle do DNA mitocondrial, verificou-se que as populações presentes em quatro tributários do Rio Paraíba do Sul (Itagacaba, Paraibuna, Preto e Santíssimo) são populações geneticamente diferentes. Para criopreservar o sêmen de pirapitinga-do-sul, testou-se alguns meios de congelamento concluiu-se que a qualidade do sêmen descongelado é maior quando o sêmen é criopreservado em glicose 365 mOsm e metilglicol. As taxas de fertilização alcançadas com o sêmen após a criopreservação foram similares ao sêmen fresco. Com esses resultados é possível planejar programas de repovoamento e de conservação da espécie, baseados no estudo genético e na reprodução artificial.

**Palavras-chave** – Banco genético, Conservação de espécies, DNA mitocondrial, Diversidade genética, Peixe.

## I. INTRODUÇÃO

A conservação da biodiversidade tem sido uma das questões importantes nas discussões sobre o uso dos recursos aquáticos. Um dos problemas referentes à geração de energia hidroelétrica, é que inevitavelmente esta se dá com danos ao meio ambiente. No caso do barramento de rios, os impactos ocorrem tanto sobre o ecossistema terrestre como aquático em vários níveis. Em um primeiro momento, a inundação de áreas de mata e florestas traz prejuízos significativos sobre a flora e fauna local. Contudo, a médio e a longo prazo, impactos sobre a fauna aquática dos rios e tributários que formam a bacia começam a ser observados, afetando profundamente a dinâmica destes ecossistemas.

Com cerca de 1.000 km, o Rio Paraíba do Sul é conside-

rado o maior rio de várzeas do Sudeste. Seu curso começa no município de Paraibuna (SP), a partir da confluência dos rios Paraitinga e Paraibuna, e atravessa o Rio de Janeiro de sul a norte. A foz está situada em Atafona (RJ) e sua bacia, com área de cerca de 57 mil km<sup>2</sup>, espalha-se pelos estados de São Paulo (38%), Rio de Janeiro (38%) e Minas Gerais (24%). Na década de 50, o rio Paraíba do Sul e seus afluentes foram considerados um dos mais piscosos do Estado de São Paulo. Ao longo dos anos, o Rio Paraíba do Sul e seus tributários vêm sofrendo represamentos, que interrompem a migração ascendente para reprodução e eliminam as áreas alagáveis necessárias para alimentação e abrigo, desmatamentos da mata ciliar e poluição em razão da industrialização e atividade agrícola nas áreas ribeirinhas. Esses impactos ambientais resultam na perda da diversidade genética implicando em danos consideráveis sobre ecossistemas terrestres e aquáticos [1]. Além disso, há a necessidade da pesca pela população ribeirinha, que tem muitas vezes no peixe, sua fonte de proteína e de renda.

A habilidade de adaptação e de resposta das espécies às frequentes mudanças ambientais ocorre devido à diversidade genética. Um dos pontos centrais para o planejamento de medidas de conservação da biodiversidade aquática é o entendimento da estrutura populacional das espécies para que se determinem tanto as respostas fisiológicas às variações ambientais como as estratégias de manejo das populações naturais [2]. Da mesma forma, em programas de repovoamento de peixes há a necessidade de assegurar a manutenção da diversidade genética dos estoques de reprodutores, de acordo com a estrutura genética e populacional da espécie no meio ambiente.

O uso de marcadores moleculares é uma ferramenta importante para determinar como a população deve ser manejada, evidenciando se a população está estruturada ou se não apresenta diferenciação. A variabilidade do DNA mitocondrial tem sido utilizada no estudo genético populacional de peixes de água doce neotropicais. O interesse do uso desta molécula para estudos populacionais e evolutivos se deve ao fato de apresentar herança citoplasmática, isto é, ser herdada via materna, de modo que não segue os padrões de segregação mendelianos e não sofre recombinações. Essa herança materna possibilita esboçar uma genealogia materna ou mesmo uma filogenia materna, o que pode facilitar a compreensão do modo de dispersão de muitos organismos, acasalamentos preferenciais, entre outros. Nesta

---

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do Programa de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico do Setor de Energia Elétrica regulado pela ANEEL e consta dos Anais do VI Congresso de Inovação Tecnológica em Energia Elétrica (VI CITENEL), realizado em Fortaleza/CE, no período de 17 a 19 de agosto de 2011.

Este Projeto de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) foi apoiado pela Companhia Energética de São Paulo (CESP) e, parcialmente apoiado pela FAPEMIG, CNPq, e CAPES.

L. H. Orfão e A. W. S. Hilsdorf trabalham na Universidade de Mogi das Cruzes (e-mails: lauraorfao@yahoo.com.br; wagner@umc.br). A.T.M. Viveiros trabalha na Universidade Federal de Lavras (e-mail: ana.viveiros@dzo.ufla.br). D. Caneppele trabalha na EHA de Paraibuna (CESP, danilo.caneppele@cesp.com.br)

molécula, existe uma região não codificadora conhecida como D-loop que contém o controle da replicação e transcrição desse genoma e é a parte mais variável do genoma mitocondrial e por isso, muito aplicável nos estudos populacionais.

Considerando a necessidade do repovoamento dos ambientes aquáticos e uma vez que a estrutura genética é conhecida, a reprodução artificial se faz necessária para que se alcance uma maior quantidade de alevinos a serem liberados nos reprovoamentos. A grande maioria das espécies de peixes criados ou mantidos em cativeiro só produzem ovócitos de boa qualidade através do uso de hormônios maturacionais, principalmente o extrato de hipófise de carpa desidratado em acetona, conhecido pelas siglas EBHC e cPE, em inglês. Os machos produzem espermatozóides viáveis sem a necessidade de aplicação de hormônios, embora seja comum aplicá-los para aumentar o volume do sêmen coletado. Os espermatozóides da grande maioria das espécies de peixes são imóveis no plasma seminal e adquirem motilidade quando entram em contato com o meio exterior: a água. Para permitir a conservação do sêmen, a ativação da motilidade dos espermatozóides deverá ser evitada utilizando-se recipientes secos, e diluidores com osmolaridade semelhante ao plasma seminal. Vários pesquisadores se dedicam a estudar e aprimorar essa técnica, inclusive no Brasil, entretanto, embora exista um número grande de estudos, ainda há ambiguidade quanto aos resultados divulgados, primariamente devido à falta de padronização das metodologias utilizadas e da análise dos dados. Algumas vantagens da criopreservação do sêmen são: a recuperação de estoques silvestres ameaçados de extinção; a redução do número de reprodutores (machos), utilizados em programas de propagação artificial com conseqüente redução de custos; a eliminação do problema da assincronia na maturidade gonadal entre reprodutores principalmente das espécies migratórias (ou de piracema), quando machos e fêmeas não estão preparados simultaneamente para a reprodução; através da preservação do sêmen, os gametas masculinos são armazenados por um determinado tempo até que os gametas femininos estejam disponíveis; o estabelecimento de programas de melhoramento genético com a utilização de machos selecionados ou manipulados geneticamente (triploides, transgênicos); a facilidade de transporte, difusão e troca de material genético entre organizações atuantes na área com risco reduzido de transmissão de patógenos; o fornecimento de materiais genéticos para a identificação de populações ou estoques através de técnicas de biologia molecular e o estabelecimento de programa de hibridização utilizando espécies com períodos reprodutivos diferentes.

A manutenção de um estoque reprodutivo ex-situ de algumas espécies de peixes vem sendo conduzida pela Companhia Energética de São Paulo (CESP). Hoje a CESP possui um plantel de indivíduos selvagens adquiridos através do empenho dos técnicos da empresa na identificação dos locais de ocorrência e da colaboração de agentes da sociedade civil também preocupados com a preservação e de intercâmbios com entidades preservacionistas. Para a ampliação genética e numérica deste plantel, a CESP desen-

volveu o projeto “Formação de um banco de germoplasma da ictiofauna ameaçada da bacia do rio Paraíba do Sul” que mapeou a distribuição genética e populacional da pirapitinga-do-sul (*Brycon opalinus*), do surubim-do-paraíba (*Steindachneridion parahybae*), da piabanha (*Brycon insignis*). O projeto teve por objetivo resgatar na natureza o que ainda resta de variabilidade genética dessas espécies e propor uma metodologia de reintrodução baseada no conhecimento da distribuição genética das populações selvagens. Esses animais foram coletados em pontos de ocorrência de populações nativas e foi feita a captura dos indivíduos vivos para manutenção do banco genético vivo na Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna. Além disso, os reprodutores capturados serviram para o estudo de protocolos de reprodução artificial e de criopreservação de sêmen.

Dentro do projeto acima citado, uma tese de doutorado foi elaborada com o objetivo geral de avaliar a diversidade genética das populações encontradas em tributário do Rio Paraíba do Sul da espécie de peixe pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* e desenvolver um protocolo para criopreservação de sêmen, auxiliando em ações de conservação dessa espécie.

A espécie pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* é uma espécie de porte médio, atingindo 35 cm e pesando até 1 kg que, assim como suas espécies congêneres, apresenta hábito alimentar onívoro. É uma espécie reofílica, ou seja, que necessita de migrações para fazer a reprodução. Porém, parece não necessitar de longas migrações para o amadurecimento gonadal e a desova. Os principais impactos que levam à redução ou mesmo ao desaparecimento das populações de pirapitinga-do-sul são aqueles relacionados à perda ou descaracterização dos ambientes ripários, tais como destruição das matas ciliares, assoreamento, poluição e barramento de rios.

Características das espécies do gênero *Brycon* como a adaptação ao cativeiro, a alimentação com ração comercial, além do crescimento rápido e do fato de ser fonte para alimentação humana fazem com que muitas espécies desse gênero sejam exploradas comercialmente. Tendo por base estas características, a pirapitinga-do-sul pode também se tornar uma nova espécie potencialmente importante para consumo humano, como já aconteceu com outras espécies. Além disso, por ser endêmica de cabeceiras de rios das bacias dos rios Paraíba do Sul e Doce, esta espécie pode ser usada como um modelo para indicar as condições ambientais, uma vez que a situação de uma comunidade de peixes é um indicador direto ou indireto do estresse do ambiente aquático como um todo.

Este trabalho faz parte do projeto “Formação de um banco de germoplasma da ictiofauna ameaçada da bacia do rio Paraíba do Sul”, código CESP/ANEEL: 0061-017/2006, concluído em dezembro de 2010. Este projeto foi executado pelas entidades parceiras: Universidade de Mogi das Cruzes, pela Universidade Federal de Lavras e a concessionária CESP- Companhia Energética de São Paulo.

## II. MATERIAL E MÉTODOS

### A. Diversidade genética da pirapitinga-do-sul

As amostras de nadadeira caudal de pirapitinga-do-sul foram coletadas durante diferentes amostragens conduzidas pela Estação de Hidrobiologia e Aquicultura da Companhia Energética de São Paulo, armazenadas em álcool etílico a 95% e estocadas a -20°C. Posteriormente foram levadas para o Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura (LAGOAA)/ Núcleo Integrado de Biotecnologia/UMC, onde todos os procedimentos laboratoriais foram realizados. As coletas foram realizadas nos seguintes tributários do Rio Paraíba do Sul: Itaguaçaba e Paraibuna, no estado de São Paulo, e Preto e Santíssimo, no estado do Rio de Janeiro. As ampliações para obtenção da região do D-loop foram feitas pela reação em cadeia da polimerase ("Polymerase Chain Reaction", PCR). Dois iniciadores foram utilizados dos quais, um foi desenhado no LAGOAA, específico para pirapitinga-do-sul: BO\_DLoop2-R (5' GAGCATGTCCACAACATATACACA 3') e o outro desenhado para curimba *Prochilodus lineatus*: F-TTF (5' GCCTAAGAGCATCGGTCTTGTA 3');[3].

As reações de PCR foram feitas com um mix de 1µM de cada iniciador, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM de dNTPs, 1 unidade de Taq DNA polimerase, 50-100 ng de DNA total, 5 µl de tampão 10× Taq e volume de água para completar 50 µl. As condições dos ciclos de amplificação do programa de gradiente de temperatura foram: denaturação inicial 94 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de denaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 54 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min com extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 0.8% e purificados usando kit (GFX™; GE Healthcare, São Paulo, Brasil). O sequenciamento foi feito em uma única direção com o iniciador F-TTF usando BigDye Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil) pela empresa MacroGen Sequencing Service (MacroGen Inc., Coreia do Sul).

A variabilidade genética foi estimada usando os seguintes parâmetros: diversidades nucleotídicas ( $\pi$ ) (Nei, 1987), diversidades haplotípicas (Hd) [4] e número de sítios polimórficos (S) pelo programa DnaSP [5]. A diversidade genética dentro e entre as populações amostradas foi hierarquicamente testada por análise molecular de variância (AMOVA; [6]) agrupando as amostras dentro de diferentes rios com 10.000 permutações para testar a significância da comparação entre pares das amostras. As amostras foram hierarquicamente divididas de acordo com sua proximidade geográfica, assim como, o rio as quais elas pertencem e os dados foram implementados no software Arlequin, versão 3.1 [7]. Os testes estatísticos D de Tajima [8] e Fs de Fu [9] foram estimados usando DnaSP [5] e aplicados para testar a existência de pressão seletiva agindo sobre as substituições.

### B. Caracterização e criopreservação de sêmen de pirapitinga-do-sul

Machos de pirapitinga-do-sul da EHA de Paraibuna foram selecionados a partir da verificação de liberação de

sêmen em resposta a uma leve massagem abdominal. Esses machos receberam 5 mg/kg de hipófise de carpa para facilitar a coleta de sêmen. Oito horas depois, a papila urogenital foi seca e o sêmen foi coletado. Imediatamente após a coleta 5 µL de sêmen de cada animal foi observado em microscópio de luz (400x). Qualquer motilidade espermática observada foi considerada como causada por contaminação com urina ou água e as amostras foram descartadas. Nas amostras com espermatozoides imóveis (n = 29 machos), 25 µL de solução ativadora (NaCl 92 mOsm/kg; 50 mM), foi colocada na mesma lâmina em uma diluição final de 1:5 (sêmen: solução ativadora). Imediatamente após ativação, a motilidade foi subjetivamente avaliada e expressa como porcentagem de espermatozoides que apresentavam motilidade progressiva. Todas as amostras possuíam mais de 80% de espermatozoides móveis após ativação. O sêmen fresco também foi avaliado quanto à duração da motilidade (avaliada com um cronômetro ligado no momento da ativação e interrompido quando 10% dos espermatozoides ainda estavam móveis), volume seminal, concentração espermática (câmara de Neubauer), o número total de espermatozoides e pH seminal. A osmolaridade do plasma seminal foi medida crioscópicamente após centrifugação do sêmen a 2000 g por 30 min. As características de todas as amostras foram avaliadas pelo mesmo técnico em temperatura ambiente (~ 22 °C).

Para desenvolver um método eficiente para criopreservar o sêmen de pirapitinga-do-sul, os seguintes parâmetros foram testados, segundo experiência prévia desse grupo de pesquisa:

- diluidores (composição e osmolaridade): foram escolhidos duas composições simples de diluidores (NaCl e glicose) combinados com duas osmolaridades (325 e 365 mOsm/kg), em um fatorial 2 x 2, identificados da seguinte forma: NaCl-325, NaCl-365, glicose-325 e glicose-365;
- crioprotetores: foram escolhidos os crioprotetores que melhor conservam o sêmen de peixes da ordem Characiformes, dimetilsulfóxido = DMSO, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO; e metilglicol = MG, CH<sub>3</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH a 1,4 M,
- tipos de palheta: para a realização da grande maioria dos experimentos, utilizamos as palhetas com volume de 0,5 mL por terem baixo custo, mas também testamos as palhetas de 4 mL por serem mais práticas no dia-a-dia da estação de reprodução;
- tempo de equilíbrio (entre a diluição do sêmen no meio de congelamento e o congelamento propriamente dito): testamos os intervalos de 15 min e de 30 min;
- temperatura de descongelamento: de acordo com nossos resultados em Characiformes, testamos o descongelamento das palhetas em banho-maria a 30°C e a 60°C.

Em todas as etapas dos experimentos, as amostras de sêmen (n = 15 machos) foram diluídas em cada meio de congelamento na proporção final de 10% sêmen, 80% de diluidor e 10% crioprotetor e mantidas em gelo por tempo de equilíbrio de 15 min ou 30 min. Em seguida, as amostras de sêmen foram envasadas em palhetas de 0,5 mL ou 4 mL, e congeladas botijão de vapor de nitrogênio (Cryoport™ LN2 dry vapor shipper, Cryoport Systems, Brea, CA, USA) a -170 °C por 24 horas quando foram transferidas para o nitrogênio líquido (M.V.E. Millenium™, XC 20, Chart, Minnesota, USA) a -196 °C. Após sete dias, as palhetas

foram descongeladas em banho-maria a 30 °C ou 60 °C. A qualidade do sêmen após o descongelamento foi avaliada quanto à motilidade espermática e duração da motilidade como descrita para o sêmen fresco e pela a contagem objetiva do número de espermatozoides vivos por meio de coloração diferenciada (eosina-nigrosina). Um total de 300 células por lâmina (1 lâmina=1 replica) foram contadas em microscópio de luz (1000x). A porcentagem de espermatozoides vivos (não corados ou rosa claro) e de espermatozoides mortos (vermelhos) foi calculada.

Num experimento seguinte, testamos a capacidade de fertilização do sêmen criopreservado de acordo com o melhor método testado acima. Assim, sêmen de quatro machos foi diluído em meio de congelamento contendo glicose 365 mOsm/kg e MG. Depois de 30 min de tempo de equilíbrio, o sêmen diluído foi envasado em palhetas de 4 mL (n = 3 palhetas x 4 machos), congeladas em vapor de nitrogênio líquido e então armazenadas em nitrogênio líquido como descrito anteriormente. Para obter os ovócitos, quatro fêmeas receberam duas doses hipófise de carpa (1 e 4,5 mg/kg de peso corporal com 12 h de intervalo. Juntamente com a segunda dose, as fêmeas receberam uma dose de gonadotrofina coriônica humana (1,45 IU hCG /g de peso corporal) e após 5 horas ocorreu a desova, seguindo os métodos de rotina da estação. Todas as fêmeas responderam positivamente ao tratamento hormonal e foram utilizadas nos testes de fertilização. As palhetas foram descongeladas a 60 °C por 48 s e a qualidade do sêmen foi avaliada quanto à sua capacidade de fertilizar ovócitos. Cerca de 100 µL de sêmen descongelado de cada palheta foi utilizado para fertilizar 0,4 g ovócitos (~ 100 ovócitos). Os ovos foram transferidos para as incubadoras de PVC e incubadas a uma temperatura de 22 °C. Para verificar a qualidade dos ovócitos, 100 µL de sêmen fresco de outro macho foi diluído em glicose-365 e utilizado para fertilizar ovócitos das mesmas fêmeas (grupo controle). O número de ovos fertilizados, expresso como porcentagem do total de ovócitos foi determinado 16 horas depois da fertilização a 22 °C.

Os dados foram expressos como média ± EPM e analisados pelo programa computacional R (versão 2.9.0; [10]). A ANOVA foi conduzida para determinar os efeitos da composição de diluidores, da osmolaridade dos diluidores, dos crioprotetores, dos tempos de equilíbrio, dos volumes das palhetas e das temperaturas de descongelamento na motilidade espermática, na duração da motilidade e na porcentagem de espermatozoides vivos.

### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### A. Diversidade genética da pirapitinga-do-sul

Durante os esforços de captura para a obtenção do material genético avaliado, foi formado na EHA Paraibuna um plantel de reprodutores com a seguinte constituição: Rio Paraibuna - 184 indivíduos; Rio Itagaçaba - 54 indivíduos; Rio Preto - 89 indivíduos; Ribeirão Santíssimo - 51 indivíduos, visando garantir a variabilidade genética nos trabalhos de repovoamento realizados pela Companhia. Os esforços de captura foram importantes para verificar as condições dos locais onde essa espécie ainda é encontrada, como estado de poluição, presença de mata ciliar e a pre-

sença de outras espécies. Observou-se também que em alguns locais onde havia a presença da pirapitinga-do-sul anteriormente, não houve sucesso dos esforços de captura, possivelmente pela degradação das condições naturais desses rios.

O uso do DNAm para verificar a estrutura populacional em peixes tem se tornado muito comum. Neste estudo, 828 pares de base da região controle foram sequenciados para verificar possíveis variações dentro ou entre os locais amostrados. O tamanho do D-loop completo da pirapitinga-do-sul é maior que 828 pares de base, uma vez que no sequenciamento perdemos o início e o fim das sequências, mesmo que os iniciadores estejam antes ou após das sequências alvos. O alinhamento final das sequências do DNAm, obtidas das 87 amostras de quatro populações de pirapitinga-do-sul analisadas (Rio Itagaçaba, Rio Paraibuna, Rio Preto, e Ribeirão Santíssimo) gerou uma matriz de dados que definiu um total de 45 haplótipos. Trezentos e trinta e um sítios polimórficos foram encontrados. Do total de haplótipos obtidos (45), dois foram compartilhados entre populações e 43 são restritos, sendo 14 restritos à população do Rio Preto, 10 restritos ao Rio Paraibuna, 10 restritos ao Rio Itagaçaba e nove restritos ao Ribeirão Santíssimo. O haplótipo mais freqüente estava presente em 17 indivíduos das populações do Rio Preto e do Ribeirão Santíssimo. A diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) observada (1,16%) entre os 45 haplótipos é considerada alta, uma vez que a pirapitinga-do-sul tem distribuição restrita e é naturalmente endêmica. Em um outro estudo [11] foi encontrado uma diversidade nucleotídica variando de 0,00 to 1,35%. Alta diversidade nucleotídicas também foram observadas em outras espécies de Characiformes, como *Colossoma macropomum* [12] da bacia amazônica, que tem diversidade variando de 1,10 a 1,12%, em *Leporinus elongatus* [13] variando de 1,78 a 7,70%, em *Prochilodus lineatus* [3] variando de 0,3 a 36%, e em *Piaractus mesopotamicus* variando de 0,9 a 5,2% [14]. A diversidade haplotípica observada em todas as populações de pirapitinga-do-sul foi alta ( $0,934 \pm 0,016$ ). Quando comparamos as diversidades haplotípicas e nucleotídicas de amostras coletadas em 1997 e 1998 nos rios Itagaçaba e Paraibuna [11] com as amostras coletadas em 2009, observamos que houve um aumento na diversidade nucleotídica do Rio Itagaçaba (de 0,0028 para 0,0136) e também o aumento da diversidade haplotípica do Rio Paraibuna (0,600 para 0,805).

O teste de D de Tajima ( $D = -2,3267$ ;  $P > 0,05$ ) não foi significativo indicando que as localidades estão em equilíbrio genético em relação aos haplótipos. O valor de  $F_s$  de  $F_u$  para a população do Ribeirão Santíssimo ( $F_s = -3,38769$ ) foi significativo, indicando que a localidade está em expansão populacional. Embora esses testes não tenham sido todos significativos ( $F_s = -2,12880$ ;  $P > 0,05$ ), os valores negativo indicam que há um excesso de mutações recentes e os mesmo são indícios de crescimento populacional ou seleção [8, 9]. O grande número de haplótipos únicos encontrados nestas populações corrobora esta hipótese, uma vez que um rápido crescimento populacional aumenta a retenção de novas mutações [15].

A comparação entre os valores  $F_{st}$  mostrou diferenças significativas entre todas as amostras (Tabela I). O maior valor encontrado foi entre o Rio Paraibuna e o Ribeirão

Santíssimo (0,31049), e o menor valor encontrado foi entre o Rio Itagaçaba e o Rio Preto (0,10989), refletindo a alta diferenciação das sequências dentro das populações.

Tabela I Valores de Fst entre os quatro locais de amostragem obtidos através das sequências do D-loop de *Brycon opalinus*

	Itagaçaba	Preto	Santíssimo	Paraibuna
Itagaçaba	-			
Preto	0,10989	-		
Santissimo	0,27252	0,21972	-	
Paraibuna	0,20263	0,14908	0,31049	-

A análise molecular de variância mostrou que grande parte da variabilidade genética está concentrada dentro das populações (78,41%), com menor percentagem entre as populações (21,59%) (Tabela II). O valor de  $\Phi_{st}$  observado foi de 0,21593, indicando que a variação entre as populações é significativa. Quando a AMOVA foi feita a partir de dois conjuntos diferentes, separando as populações por localização geográfica, do Rio Preto e Ribeirão Santíssimo das populações do Rio Itagaçaba e Rio Paraibuna, nenhuma variação foi encontrada. A análise molecular de variância indica que há diferenciação genética entre as populações, sugerindo que cada população deve ser tratada como um estoque geneticamente diferente. Este resultado está de acordo com estudos anteriores utilizando DNAmT e micros-satelites [11, 16]. Em ambos os trabalhos, essa diferenciação entre as populações de pirapitinga-do-sul foi observada. O conhecimento dos efeitos da variabilidade genética em uma população de peixes é de fundamental importância para o entendimento de como essa diversidade está distribuída em uma espécie. Se a espécie apresenta diversidade contínua, qualquer área de sua distribuição é representativa da espécie, enquanto que, havendo estruturação, a representatividade de cada população terá que ser preservada.

Tabela II Análise molecular de variância (AMOVA) para *Brycon opalinus*, considerando todas as populações como um único grupo

Fonte da variação	Componentes da variância	Porcentagem da variância	$\Phi$ -estatística	P-value
Entre as populações	0,10759	21,02	$\Phi_{st}=0,217$	<0,05
Dentro das populações	0,39066	78,20		> 0,05

Baseando-se nos resultados encontrados, podemos definir cada população coletada nos quatro tributários diferentes como unidades evolutivas [17]. Dessa forma, se torna imperiosa a manutenção dos estoques de reprodutores em bancos genéticos diferentes, evitando assim que adaptações e a estabilidade genética locais sejam perdidas. É necessário ainda que os cruzamentos durante a reprodução artificial sejam delineados tendo em vista essa diferenciação genética e o número mínimo de reprodutores necessários. O uso do estoque fundador de reprodutores para o programa de repovoamento pode levar ao gargalo genético, conhecido também como efeito fundador, que é a perda de variabilidade genética ocorrida quando o estoque fundador é iniciado com pequeno número de indivíduos. Para se ter acima de 99% de variabilidade genética retida, o número de exemplares de estoque fundador tem que ser no mínimo de

50 indivíduos [18]. Com os esforços de captura esse número foi alcançado para os quatro tributários.

A decisão de repovoar ou não uma espécie de peixe deve levar em consideração o material genético já presente no local e as condições do ambiente onde o repovoamento será feito. Por exemplo, em um rio com poucos exemplares de uma espécie - causada pela pesca excessiva -, porém com mata ciliar e qualidade de água preservada, é possível que os indivíduos presentes naquele local possam manter ou ainda recuperar o tamanho da população local, sem que seja necessário aplicar técnicas de repovoamento e desde que sejam tomadas medidas para controlar a pesca. De uma forma mais extrema, pode-se optar por repovoar com progênie obtida de reprodutores do próprio local, mantidos em cativeiros. Já em casos onde o ambiente está depauperado e a espécie já é considerada extinta, medidas como a recuperação do ambiente e repovoamento com material do próprio local ou ainda de outros locais se fazem necessárias. Os programas de repovoamento com alevinos têm sido uma questão de importância em diferentes países. Estudos têm sugerido que a reprodução em cativeiro pode ter um impacto negativo sobre a reprodução natural e adequação de alevinos liberados no ambiente selvagem [19]. Por outro lado, o uso de indivíduos criados em cativeiro para a reconstituição de estoques esgotados em alguns casos, aumentou a contribuição para pesca [20, 21].

#### B. Caracterização, criopreservação e fertilização com sêmen de pirapitinga-do-sul

As características do sêmen fresco de pirapitinga-do-sul após indução com extrato de hipófise estão descritas na tabela III. Os valores de volume seminal (7,7 mL), pH (8,3) e a osmolaridade do plasma seminal (318 mOsm/kg) encontrados neste estudo estão dentro da variação observada para outras espécies de Characiformes [22].

Tabela III. Características do sêmen fresco de pirapitinga-do-sul.

Parâmetros	n <sup>1</sup>	Média ± EPM <sup>2</sup>
Motilidade após ativação (%)	29	94 ± 1
Duração da motilidade (s)	29	99 ± 2
Volume seminal (mL)	29	7.7 ± 0.8
Concentração (sptz x 10 <sup>9</sup> /mL)	29	60.3 ± 3.2
Número total de sptz (x 10 <sup>9</sup> )	29	435 ± 40
pH seminal	25	8.3 ± 0.1
Osmolaridade plasma seminal (mOsm/kg)	18	318 ± 3

<sup>1</sup>n é o número de animais utilizados

<sup>2</sup>EPM: erro padrão da média

A concentração espermática (60,3 x 10<sup>9</sup> sptz/mL), entretanto, foi superior aos valores observados em Characiformes, que variam de 4,4 x 10<sup>9</sup> sptz/mL em piaussú *Leporinus macrocephalus* até 37,7 x 10<sup>9</sup> sptz/mL em pacu *Piaractus mesopotamicus* [22].

Uma correlação negativa foi observada entre o volume seminal e a concentração espermática. Após o tratamento hormonal para induzir a espermição, o primeiro evento observado é a hidratação testicular que leva a um aumento do volume de sêmen extraído e a diluição dos espermatozoides [23]. Por outro lado uma correlação positiva entre o volume seminal e o número total de espermatozoides foi

observada. Nesta espécie de peixe, aumentando o volume seminal, mesmo em concentrações baixas de espermatozoides, leva-se a um aumento do número total de espermatozoides no sêmen extraído. O sêmen fresco de pirapitinga-do-sul apresentou 94% de espermatozoides móveis e 99 s de duração da motilidade, após ativação. Em outras espécies do gênero *Brycon*, o sêmen fresco possuiu de 56 a 100% de espermatozoides móveis e de 33 a 56 s de duração [22]. O melhor conhecimento das características da motilidade do sêmen fresco antes de qualquer manipulação é necessário para avaliar a qualidade espermática antes das produções artificiais e de experimentos.

De acordo com a ANOVA, a motilidade espermática, a duração da motilidade e a porcentagem de espermatozoides vivos foram significativamente maiores quando a osmolaridade do diluidor foi 365 mOsm/kg comparado a 325 mOsm/kg. Estudos com o objetivo de investigar os efeitos da osmolaridade de diluidores são na maioria das vezes delineados para avaliar a osmolaridade antes da criopreservação ou seu efeito nas soluções ativadoras. Descrições sobre o efeito da osmolaridade do diluidor na qualidade espermática pós-descongelamento são escassos na criopreservação de sêmen de peixes.

A composição do diluidor e o crioprotetor não afetaram a motilidade espermática, a duração da motilidade ou a porcentagem de espermatozoides vivos. Na maioria dos estudos com sêmen de Characiformes, glicose (5%; 277 mOsm/kg) e o NaCl (0,9%; 285 mOsm/kg) são comumente utilizados como diluidores. Uma interação eficiente entre diluidores (composição e osmolaridades) e crioprotetores é necessária para definir o melhor meio de congelamento para uma determinada espécie. Neste estudo, DMSO foi melhor crioprotetor do que MG combinado com NaCl, e MG foi melhor crioprotetor do que o DMSO quando combinado com a glicose. O DMSO e o MG tem pesos moleculares similares (aproximadamente 78 g/mol e 76 g/mol, respectivamente), logo essa interação diluidor-crioprotetor provavelmente não é relacionada a permeabilidade celular. O mecanismo pelo qual o crioprotetor é efetivo ainda permanece sob estudo [24]. Mais experimentos devem ser especificadamente delineados para definir essa interação diluidor-crioprotetor.

Quando o tempo de equilíbrio foi analisado, o sêmen reservado por 30 min em contato com o meio de congelamento apresentou mais espermatozoides vivos do que quando o sêmen foi reservado por 15 min. O tempo de equilíbrio não afetou a motilidade espermática e a duração da motilidade. A partir desse resultado o tempo de equilíbrio de 30 min foi adotado nos experimentos posteriores, principalmente quando muitos animais são manuseados ao mesmo tempo, facilitando o manejo das palhetas.

O volume da palheta não afetou as variáveis analisadas. Assim, nos experimentos posteriores as palhetas de 4 mL foram usadas. Considerando que nas palhetas de 4 mL armazenamos um número maior de espermatozoides, apenas uma palheta pode ser utilizada para fertilizar ovócitos de várias fêmeas, tornando a reprodução artificial mais prática.

A motilidade espermática, a duração da motilidade e a

porcentagem de espermatozoides vivos foram significativamente maiores quando a temperatura de descongelamento foi 60°C comparado a 30 °C. Essa temperatura de 60 °C é comumente usada para descongelar sêmen de Characiformes [22].

Em geral, entre todos os tratamentos avaliados, o sêmen diluído em glicose-365-MG, congelado em palhetas de 4 mL com 30 min de tempo de equilíbrio e descongelado a 60 °C produziu as maiores taxas de motilidade, as mais longas durações e as maiores taxas de espermatozoides vivos. Na tabela IV, apresentamos a comparação entre o sêmen fresco e o sêmen congelado neste melhor tratamento.

Table IV Motilidade espermática, duração da motilidade e espermatozoides vivos no sêmen fresco e após o congelamento em glicose 365 mOsm/kg e metilglicol, em palhetas de 4 mL com 30 min de tempo de equilíbrio e descongelado a 60 °C (média ± EPM;) de pirapitinga-do-sul.

	Sêmen fresco (n=3 machos)	Sêmen descongelado (n=8 machos)
Motilidade espermática (%)	100*	73 ± 5
Duração da motilidade (s)	120*	47 ± 3
Espermatozoides Vivos (%)	95*	68 ± 3

Diferenças entre o sêmen fresco e descongelado são indicadas com \* quando significativas (F; P<0,05).

Embora, estatisticamente a qualidade do sêmen fresco tenha sido superior ao sêmen descongelado, a criopreservação de sêmen de pirapitinga-do-sul mostrou resultados satisfatórios quanto a motilidade, duração e porcentagem de espermatozoides vivos.

No experimento seguinte, o sêmen congelado no melhor método, em glicose-365-MG, congelado em palhetas de 4 mL com 30 min de tempo de equilíbrio e descongelado em banho-maria a 60°C, foi avaliado quanto à capacidade de fertilizar (Tabela V). A porcentagem de ovócitos fertilizados com sêmen fresco controle (78%) foi significativamente maior do que com sêmen descongelado (42%). O mesmo ocorre em relação às taxas de eclosão: 57% com o sêmen fresco e 33% com o sêmen descongelado.

Table V Taxas de fertilização e de eclosão dos ovócitos fertilizados com sêmen fresco e após o congelamento em glicose 365 mOsm/kg e metilglicol, em palhetas de 4 mL com 30 min de tempo de equilíbrio e descongelado a 60 °C (média ± EPM) de pirapitinga-do-sul.

	Sêmen fresco	Sêmen descongelado
Fertilização (%)	78 ± 6*	42 ± 7
Eclosão (%)	57 ± 7*	33 ± 8

Diferenças entre o sêmen fresco e descongelado são indicadas com \* quando significativas (F; P<0,05).

Entretanto, essas taxas são consideradas boas dentro de uma estação de reprodução em que a espécie em questão está em vias de extinção. Assim, é possível coletar o sêmen de exemplares eventualmente capturados no rio, de outras pisciculturas, ou de um período reprodutivo, e usá-lo quando e onde quiser, sem risco de não haver reprodução da

espécie por falta de machos espermiando. Outra vantagem da criopreservação é a troca de material genético sem o risco de transmitir doenças de uma estação para outra. É importante aqui lembrar que foi observada diversidade de populações de pirapitinga-do-sul nos diferentes tributários e isso deve ser levado em consideração quando se formar um banco de sêmen para essa espécie. A identificação e o uso durante a reprodução artificial de todo material coletado deve ser rigorosa.

#### IV. CONCLUSÕES

Neste trabalho, são apresentadas informações sobre variabilidade genética e a criopreservação de sêmen de pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus*.

O conhecimento da variabilidade genética da pirapitinga-do-sul é fundamental para traçar estratégias de conservação para esta espécie. Como as amostras avaliadas mostraram-se estruturadas, cada população dos tributários do rio Paraíba do sul deve ser considerada como uma população única e diferenciada das outras. O manejo dessas populações para fins de repovoamento deve ser diferenciado, mantendo-se os reprodutores isolados e a reprodução artificial levar em consideração a caracterização genética.

A criopreservação de sêmen é uma técnica que auxilia na reprodução artificial. No caso da espécie em estudo, por exemplo, pode-se deslocar uma equipe para os locais dos tributários onde se encontra a espécie para que se faça a coleta do sêmen na natureza. A formação de um banco de sêmen deve considerar a caracterização genética da espécie e, por isso, uma identificação minuciosa de todo material preservado precisa ser feita.

Os programas de repovoamento e outras ações para conservação da ictiofauna são objetos de vários estudos que tentam demonstrar sua eficácia. A reprodução artificial para fins de repovoamento, por exemplo, é muito questionada quanto à perda da variabilidade genética ou ainda da adaptação dos indivíduos que são liberados na natureza. Se esses programas forem delineados a partir das informações genéticas das populações e ainda utilizando gametas de grande número de reprodutores, esses efeitos negativos podem ser minimizados.

Devido à grande diversidade da ictiofauna brasileira, as informações existentes relativas às espécies de peixes e sua variabilidade genética ou criopreservação de sêmen ainda são insuficientes. As técnicas usadas neste estudo podem ser aplicadas a outras espécies, sejam elas de importância ecológica ou comercial, as quais necessitam de mais conhecimento para a conservação ou melhoramento genético.

Em futuros estudos, pretende-se avaliar os efeitos da criopreservação de sêmen na progênie obtida, com variáveis como número de larvas anormais, proporção sexual, entre outras. O desenvolvimento de técnicas para criopreservação ovócitos também se faz necessário, buscando maior eficiência da reprodução artificial.

Uma vez que temos o conhecimento da diversidade genética de um estoque fundador, deve-se buscar formas de monitoramento genético para verificar se o repovoamento

dos rios estão sendo efetivos. Um exemplo seria avaliar continuamente a população dos rios que foram repovoados para saber se a houve o restabelecimento da população.

#### V. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Agência Nacional de Energia Elétrica, a Companhia Energética de São Paulo, ao Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes (SP), ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (MG) e também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e a Furnas Centrais Elétricas pelas bolsas concedidas.

#### VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. N. Bruton, "Have fishes had their chips? The dilemma of threatened fishes" *Environmental Biology of Fishes*, vol. 43, pp. 1-27, Dec. 1995.
- [2] R. G. Danzmann, P.E. Ihssen, P.D.N. Hebert, "Genetic discrimination of wild and hatchery populations of brook charr, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), in Ontario using mitochondrial DNA analysis," *Journal of Fish Biology*, vol. 39, pp. 69-77, Dec. 1991.
- [3] A. Sivasundar, E. Bermingham, G. Ortí, "Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers," *Molecular Ecology*, vol. 10, pp. 407-417, Feb. 2001.
- [4] M. Nei, F. Tajima, "DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases". *Genetics*, vol. 97, pp. 145-163, Apr. 1981.
- [5] J. Rozas, J.C. Sanchez-DelBarrio, X. Messenguer, R. Rozas, "DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods". *Bioinformatics*, vol. 19, pp. 2496-2497, Jun. 2003.
- [6] L. Excoffier, P.E. Smouse, J.M. Quattro, "Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data", *Genetics*, vol. 131, pp. 479-491, May. 1992.
- [7] L. Excoffier, G. Laval, S. Schneider, "Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis," *Evol. Bioinformatics Online*, vol. 1, pp. 47-50, Jul. 2005.
- [8] F. Tajima, "Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism," *Genetics*, vol. 123, pp. 585-595, Aug. 1989.
- [9] Y.-X. Fu, "Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection," *Genetics*, vol. 147, pp. 915-925, Dec. 1997.
- [10] R Development Core Team, "R: a language and environment for statistical computing", *R Foundation for Statistical Computing*. 2007.
- [11] A.W.S. Hilsdorf, A.M.A. Espin, M.H. Krieger, J.E. Krieger, "Mitochondrial DNA diversity in wild and captivity population of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) in the Paraíba do Sul Basin, Brazil," *Aquaculture*, vol. 214, pp. 81-91, Mar. 2002.
- [12] M.C.F. Santos, M.L. Ruffino, I.P. Farias, "High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River," *J. Fish Biol.*, vol. 71, pp. 33-44, Aug. 2007.
- [13] C. Martins, A.P. Wasko, C. Oliveira, F. Foresti, "Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin," *Genet. Mol. Biol.* vol. 26, pp. 33-38, Jul. 2003.
- [14] F. Iervolino, E.K. Resende, A.W.S. Hilsdorf, "The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) population in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management," *Fisheries Research* vol. 101, pp. 27-31, Sep. 2010.
- [15] J.C. Avise, *Molecular markers, natural history and evolution* vol I. New York: Chapman & Hall, 1994, p. 551.
- [16] R.M. Barroso, A.W.S. Hilsdorf, H.L.M. Moreira, A.M. Mello, S.E.F. Guimarães, P.H. Cabello, Y.M. Traub-Cseko, "Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus*

(Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae),” *Mol. Ecol.* vol. 3, pp. 297-298, Apr. 2003.

- [17] C. Moritz and W.M. Brown, “Tandem duplication in animal mitochondrial DNAs: variation in incidence and gene content among lizards,” in *Proc 1987 National Academy of Sciences*, p. 7183-7187.
- [18] S.A. Toledo-Filho, L.F. Almeida-Toledo, F. Foresti, E. Galhardo, E. Donola, “Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios,” em *Cadernos de Ictiologia* vol.1, 1992, pp. 1-39.
- [19] H. Araki, B. Cooper, M. Blouin, “Genetic effects of captive breeding cause a rapid cumulative fitness decline in the wild,” *Science* vol. 318, pp. 100-103, Dec. 2007.
- [20] K.M Leber, “Rationale for an experimental approach to stock enhancement” in *Stock enhancement and sea ranching* vol 1, Oxford: Fishing News Book, Blackwell Science Ltd, 1999 p. 63-75.
- [21] E.L. Brannon, D.F. Amend, M.A. Cronin, J.E. Lannan, S. LaPatra, W.J. McNeil, R.E. Noble, C.E. Smith, A.J. Talbot, G.A. Wedemeyer, H. Wester, “The controversy about Salmon hatcheries,” *Fisheries* vol.29, pp. 12-31, Mar. 2004.
- [22] A.T.M. Viveiros, H.P. Godinho, “Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review,” *Fish Physiol. Biochem.* vol. 35, pp. 137-150, Jun 2009.
- [23] A.T.M. Viveiros, Y. Fessehaye, M. ter Veld, R.W. Schulz, J. Komen, “Hand-stripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*.” *Aquaculture* vol. 213, pp.373-386, Feb. 2002.
- [24] A.T.M. Viveiros, “Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish,” in *Proc. 2005 Anim Breed Abst.*, pp.1-10.