



**FELIPE GUEDES DE ARAÚJO**

**ÁCIDOS GRAXOS DIETÉTICOS EM  
PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE FÊMEAS  
DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

**LAVRAS – MG**

**2012**

**FELIPE GUEDES DE ARAUJO**

**ATUAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DIETÉTICOS SOBRE  
DIFERENTES PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE *ZEBRAFISH*  
(*Danio rerio*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de Monogástricos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Priscila Vieira e Rosa

**LAVRAS – MG**

**2012**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Araújo, Felipe Guedes de.

Ácidos graxos dietéticos em parâmetros reprodutivos de fêmeas de *zebrafish* (*Danio rerio*) / Felipe Guedes de Araújo. – Lavras : UFLA, 2012.

104 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Priscila Vieira e Rosa.

Bibliografia.

1. Peixes de água doce. 2. Reprodução. 3. Embriões. 4. Estradiol. 5. Lipídeos. 6. Nutrição. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.37520416

**FELIPE GUEDES DE ARAUJO**

**ATUAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DIETÉTICOS SOBRE  
DIFERENTES PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE *ZEBRAFISH*  
(*Danio rerio*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de Monogástricos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 24 de Fevereiro de 2012.

Dr. Luis David Solis Murgas

Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas

Dr. Rodrigo Fortes da Silva

Dra. Paula Adriane Perez Ribeiro



Dra. Priscila Vieira e Rosa  
Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2012**

### **Dedico**

À mulher da minha vida Sabrina pelo apoio incondicional em todos os momentos, ao Raul, a quem considero como filho, pela amizade e incentivo, à minha mãe Isabel e meu pai José Oswaldo por compreenderem minha ausência e por me apoiarem incondicionalmente, com amor e dedicação, ao Marcos por estar sempre ao meu lado e a meu avó Alberto pelo exemplo de vida e pelo carinho que sempre teve comigo.

## AGRADECIMENTOS

A todos que tiveram um papel importante na concretização deste trabalho de tese, em especial:

À minha orientadora, Priscila Vieira e Rosa, pela cumplicidade e amizade.

Ao CNPq pela bolsa de estudos e à CAPES pelo auxílio financeiro durante minha estadia no exterior.

Ao colega Daniel Okamura pelo companheirismo e amizade durante todas as etapas deste projeto.

Aos colegas Leandro Santos Costa e Marinez Moraes pela valorosa ajuda no cuidado dos peixes.

À Monica Ferreira pela orientação e ajuda na avaliação dos embriões.

Aos amigos do IBR na Argentina, especialmente a Dra. Silvia Arranz e Dr Andres Sciara pelos conhecimentos passados.

À Deus por tornar tudo possível, Agradeço!

## RESUMO

Os lipídeos são as macromoléculas mais estudadas dentro da nutrição, no entanto, ainda são as menos compreendidas. Apesar disso, sua relevância como nutriente, especialmente na alimentação de matrizes, vem sendo repetidamente comprovada ao longo dos anos. Na última década, o *zebrafish* (*Danio rerio*) conquistou espaço no campo da biologia reprodutiva em função de sua versatilidade como modelo biológico, porém, o conhecimento sobre as exigências nutricionais dos reprodutores continua elusivo. Buscando melhor entendimento de como os ácidos graxos poli-insaturados da dieta atuam nos mecanismos da reprodução foi realizado um ensaio nutricional, onde se trabalhou quatro dietas isoproteicas e isoenergéticas que, exceto pelas fontes de óleo (oliva, linhaça, óleo de peixe e de milho), tinham a mesma composição. A alimentação foi feita por cinco meses e o manejo reprodutivo dos animais, semanalmente, durante os dois últimos meses. Foram avaliados perfis lipídicos da carcaça e ovários, estradiol corporal, teor proteico dos ovários, desenvolvimento embrionário, taxa de eclosão e diâmetros do saco vitelínico dos embriões. Os resultados mostraram que a suplementação de matrizes com óleo de peixe proporciona uma maior taxa de eclosão dos embriões e que a presença do ácido araquidônico influencia positivamente o desenvolvimento embrionário inicial (8-9 hpf). Também constatou-se o efeito dos lipídeos sobre o nível de estradiol. Fêmeas que receberam óleo de origem vegetal apresentaram níveis mais baixos do hormônio, quando comparado com os animais tratados com óleo de peixe. Em vista dos resultados obtidos constatou-se que ambos, n-3 e n-6, são necessários para se obter um bom desempenho reprodutivo.

Palavras-chave: Embriões. Estradiol. Lipídeos. Reprodução. Peixes.

## ABSTRACT

The lipids are the most studied macromolecules into nutrition, however, are still the most misunderstood. Nevertheless, its importance as a nutrient, especially in food matrices, has been repeatedly proven over the years. In the last decade, the zebrafish (*Danio rerio*) won space in the field of reproductive biology due to its versatility as a biological model, however, knowledge about the nutritional requirements of breeding remains elusive. Seeking better understanding of how polyunsaturated fatty acids in the diet act in the mechanisms of reproduction, nutritional trials were carried out, where its worked four isoproteic and isoenergetic diets, that except for the oil sources (olive, flaxseed, fish oil and corn), had the same composition. The feed was done for five months and the reproductive management of animals weekly during the last two months. Lipid profiles of the carcass and ovaries, estradiol body, protein content of the ovaries, embryo development, hatching rate and diameter of the yolk sac of embryos were evaluated. The results showed that matrices supplementation with fish oil provides a higher rate of embryos hatching and the presence of arachidonic acid influence positively the early embryonic development (8-9 hpf). Also it was observed the effect of lipids on the estradiol level. Females who received vegetable oil had lower levels of the hormone as compared with animals treated with fish oil. In view of these results obtained it was found that both n-3 and n-6, are required to obtain a good reproductive performance.

Keywords: Embryos. Estradiol. Lipids. Reproduction. Fish.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Número de genes descritos, pesquisadores e publicações utilizando o modelo <i>zebrafish</i> ao longo dos anos. Estatísticas retiradas de University of Oregon (2012).....	16
Figura 2	Relação filogenética entre o <i>zebrafish</i> , outros peixes e humanos, segundo Steinke, Salzburger e Meyer (2006) .....	18
Figura 3	Rotas de alongação e dessaturação de C-18 para produzir HUFA em hepatócitos de peixes .....	24
Figura 4	Resumo do transporte de lipídeos .....	28

### SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

#### ARTIGO 1

Figure 1	Representation of the measurements taken from embryos.....	63
Figure 2	Female zebrafish whole body oestradiol concentration. Columns with different superscript letters are significantly different as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test (P-Value = 0.0697 significant at alpha = 0.07).....	68
Figure 3	Box-and-whisker plot of developmental score at 8-9hpf. Columns with different superscript letters are significantly different as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test (P-Value = 0.00697456). .....	69
Figure 4	Box-and-whisker plot of developmental score at 23-25hpf. ....	70
Figure 5	Box-and-whisker plot of developmental score at 30-34hpf. ....	70
Figure 6	Box-and-whisker plot of developmental score at 48-50hpf. ....	71

Figure 7	Eclosion rate at 72hpf. Columns with different superscript letters are significantly different as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test (P value = 0.0623; significant at alpha = 0.07).....	72
Figure 8	The largest and shortest diameters of the vitelinic sac at 8-9hpf. Columns with different superscript letters in the same measurement are significantly different as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test (largest diameter p value: 0.0105; shortest diameter p value: 0.0004).....	73
Figure 9	Zebrafish ovary total protein levels (dry matter basis). Columns with same superscript letters are not significantly different as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test (P value: 0.304). .....	74

## **LISTA DE TABELAS**

### **SEGUNDA PARTE-ARTIGOS**

#### **ARTIGO 1**

Table 1	Experimental diet composition.....	59
Table 2	Developmental score system.....	64
Table 3	Selected fatty acids in the zebrafish carcass lipid profile.....	66
Table 4	Selected fatty acids in zebrafish ovary lipid profiles.....	67
Table 5	Pearson correlation coefficient for oestradiol and HUFAs .....	68

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	13
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1	<i>Zebrafish</i> como modelo biológico .....	15
2.2	Lipídeos na nutrição de peixes .....	19
2.2.1	Definição de ácidos graxos e de essencialidade .....	19
2.2.2	Síntese de ácidos graxos poli-insaturados .....	23
2.2.3	Digestão de lipídeos em peixes .....	25
2.2.4	Absorção de lipídeos.....	26
2.2.5	Transporte extracelular de lipídeos .....	27
2.2.5.1	Transporte de lipídeos na rota exógena.....	28
2.2.5.2	Transporte de lipídeos na rota endógena .....	30
2.2.6	Eicosanoides .....	31
2.2.7	Lipídeos e reprodução.....	32
2.3	O papel do estradiol .....	34
2.4	Ontogenia do ovócito e formação dos ovos de peixe.....	38
2.4.1	Vitelogênese.....	39
2.4.1.1	Acúmulo de lipídeos .....	39
2.4.1.2	Vitelogeninas.....	40
3	<b>CONCLUSÃO</b> .....	41
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGO</b> .....	52
	<b>ARTIGO 1 Differential regulation of reproductive parameters by dietary fatty acids in zebrafish: effects on ovary composition, estradiol level, embryonic development, and eclosion rate.....</b>	52
1	<b>INTRODUCTION</b> .....	55
2	<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	58
2.1	Animal housing and experimental diets .....	58
2.2	Sample collection .....	60
2.3	Lipid extraction and fatty acid analysis .....	60
2.4	Oestradiol extraction and analysis.....	61
2.5	Ovary total protein quantification .....	61
2.6	Embryonic developmental evaluation .....	62
2.7	Statistical analysis.....	64
3	<b>RESULTS</b> .....	66
3.1	Fatty acid analysis .....	66
3.2	Oestradiol analysis .....	68

3.3	Embryo development .....	69
3.4	Embryo vitelinic sac measurements.....	72
3.5	Protein content of the ovaries.....	73
4	DISCUSSION.....	75
4.1	Carcass lipid profile .....	75
4.2	Lipid profile of ovaries.....	75
4.3	Whole body oestradiol level.....	77
4.4	Total protein content of ovaries .....	78
4.5	Developmental score.....	79
4.6	Eclosion rate.....	81
4.7	Embryo vitelinic sac measurements.....	82
5	CONCLUSIONS.....	83
	REFERENCES .....	84
	APÊNDICES .....	91

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

Os estudos sobre lipídeos têm dominado o espaço dos periódicos científicos e também das conferências e congressos sobre nutrição de peixes há bastante tempo. Isso de forma alguma significa que esses nutrientes são mais importantes que os outros para a saúde dos peixes, mas é um reflexo da complexidade do metabolismo dos lipídeos.

Por volta do ano 2000 já se tinha um entendimento bioquímico detalhado dos carboidratos e aminoácidos e suas rotas de síntese, catabolismo e enzimas envolvidas, ao passo que, as rotas catabólicas e anabólicas de alguns ácidos graxos, em particular os poli-insaturados, ainda estão sendo definidas.

Apesar do entendimento limitado dos lipídeos, sua importância para a saúde crescimento e reprodução dos peixes é inquestionável. Os ácidos graxos altamente insaturados das famílias ômega 3 (n-3) e ômega 6 (n-6) têm sido relacionados ao sucesso reprodutivo dos peixes de diferentes espécies, porém, ainda se sabe muito pouco sobre as rotas pelas quais esses ácidos atuam.

Os lipídeos da dieta de peixes em cultivo vêm de diferentes fontes, porém, o principal ingrediente adicionado nas formulações ainda é o óleo de peixe. Atualmente existe a preocupação por parte dos nutricionistas em utilizar fontes de lipídeos mais sustentáveis, como os óleos de origem vegetal, para compor as dietas aquícolas, no entanto, os efeitos de tais substituições devem ser investigados com cautela, e se faz necessário um conhecimento mais profundo de como a fisiologia reprodutiva do animal é afetada.

Estudos nutricionais com reprodutores de peixe são relativamente escassos quando comparados aos estudos com animais em crescimento, e a razão principal para isso é a dificuldade em alojar um grande número de matrizes

(geralmente de grande porte) em grupos separados para conduzir os experimentos.

O *zebrafish* (*Danio rerio*) tem ganhado espaço rapidamente como modelo nos estudos dos mais variados aspectos do metabolismo lipídico dos vertebrados. Além de seu *status* como modelo nas pesquisas de biologia do desenvolvimento, a versatilidade do *zebrafish* também foi estendida ao campo da biologia reprodutiva devido à sua prolificidade e facilidade de manipulação das células foliculares e embriões em condições de laboratório, tendo ainda como vantagem a facilidade de se alojar um grande número de matrizes em pequenos laboratórios.

Apesar da grande popularidade do *zebrafish* como organismo-modelo nas pesquisas biomédicas, o conhecimento de suas exigências nutricionais permanece elusivo e a relevância do perfil lipídico da dieta para o sucesso reprodutivo ainda foi pouco estudada. A presente tese trata dessa temática avaliando como diferentes fontes de óleo na dieta de reprodutores de *zebrafish* influenciam seu potencial reprodutivo e a qualidade dos embriões, utilizando-se como parâmetros o desenvolvimento embrionário, taxa de eclosão, composição da carcaça e ovários e teor de estradiol corporal.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Zebrafish* como modelo biológico

O *zebrafish* (*Danio rerio*) é um peixe tropical de água doce proveniente dos rios do Sul da Ásia, principalmente do Norte da Índia, Paquistão, Butão e Nepal. Pertence a família *Cyprinidae*, classe *Actinopterygii*, e ordem *Teleostei*.

Na década de 2000, o *zebrafish* se tornou o organismo-modelo de predileção nas pesquisas biomédicas, especialmente para os pesquisadores envolvidos no estudo do controle genético do desenvolvimento embrionário. A razão disso está principalmente no fato de que o *zebrafish* reúne uma série de vantagens experimentais que outros modelos animais não oferecem, como a facilidade de manutenção das matrizes, o desenvolvimento externo dos embriões, a transparência do córion e dos embriões, que permite rastrear a expressão gênica monitorando genes repórteres (ex: GFP (*green fluorescent protein*) e seus derivados) e o desenvolvimento dos órgãos e tecidos *in vivo*, a resistência à manipulação dos embriões em procedimentos como microinjeções e transplante de células (BRIGGS, 2002; LONG et al., 1997).

O *zebrafish* também produz um grande número de descendentes quando comparado a outros organismos modelos (como por exemplo, o rato) e, além disso, possui uma produção constante de ovos, fato que o distingue da maioria das espécies de peixe cultivadas. Quando mantidos em condições apropriadas, uma única fêmea pode produzir cerca de 200 ovos por semana durante todo o ano (LAWRENCE, 2007).

De acordo com a base de dados do modelo *zebrafish*, *zfin*, o número de pesquisas publicadas no mundo utilizando o *zebrafish* como modelo biológico aumentou de 2.415, no ano de 1999, para 12.114 em 2009 e o número de laboratórios cadastrados trabalhando com *zebrafish* aumentou de 228 para 626,



no mesmo período. O número de genes sequenciados aumentou de 220, em 1998, para 30.796, em 2009 (Figura 1).

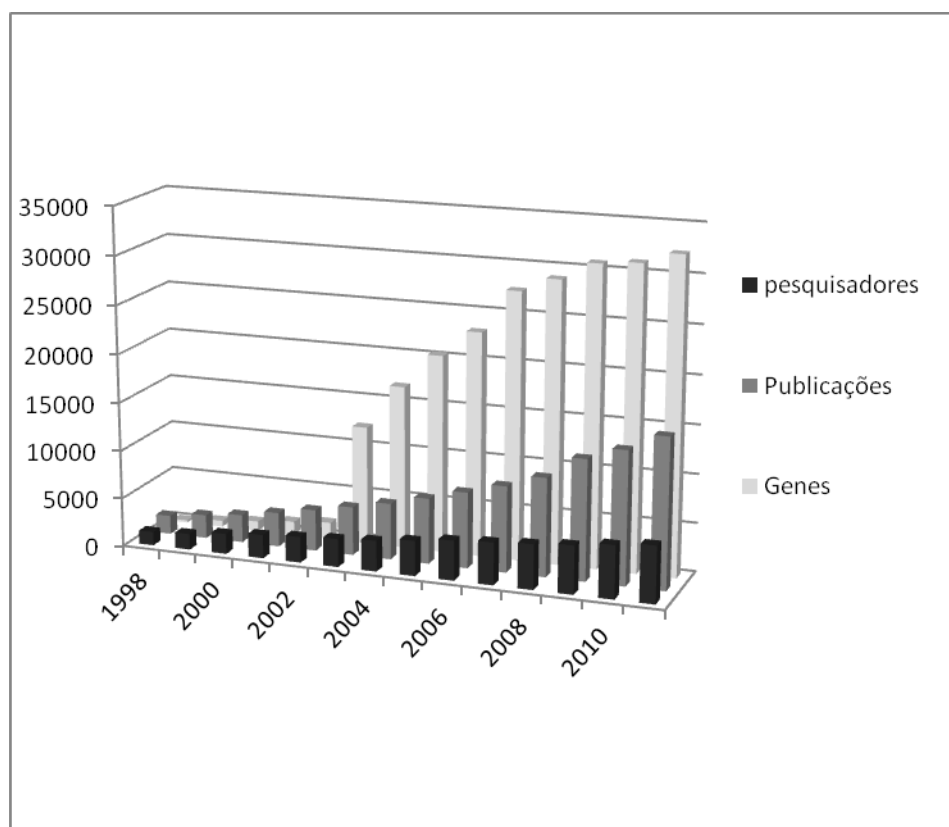


Figura 1 Número de genes descritos, pesquisadores e publicações utilizando o modelo *zebrafish* ao longo dos anos. Estatísticas retiradas de University of Oregon (2012).

A aquicultura tem sido beneficiada enormemente pela expansão das pesquisas com *zebrafish*. As vantagens desse modelo combinadas com as ferramentas para manipulação e análise genética tornaram o *zebrafish* particularmente adequado para estudar diferentes rotas de regulação gênica de

maneira mais conveniente e barata, que em qualquer outra espécie de peixe cultivada. Os resultados obtidos nos estudos de nutrição, crescimento, resistência a doenças, estresse e reprodução produzem resultados com grande aplicabilidade no cultivo de peixes (DAHM; GEISLER, 2006). A Figura 2 demonstra a relação entre o *zebrafish* e outras espécies de peixe.

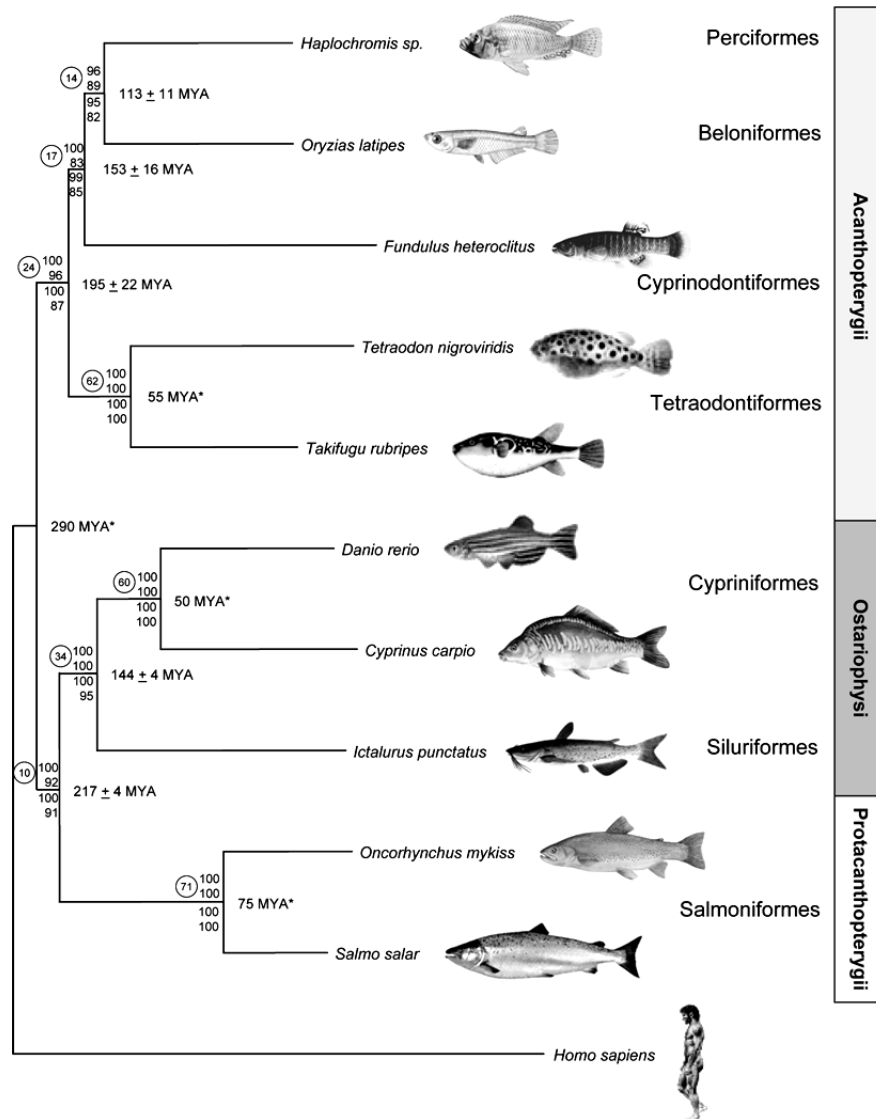


Figura 2 Relação filogenética entre o *zebrafish*, outros peixes e humanos, segundo Steinke, Salzburger e Meyer (2006)

## 2.2 Lipídeos na nutrição de peixes

O metabolismo lipídico talvez seja o mais estudado dentro da nutrição, no entanto, continua sendo o menos compreendido, apesar dos esforços em pesquisa direcionados ao estudo desse nutriente na aquicultura (SARGENT et al., 1999a; SARGENT; TOCHER; BELL, 2002). No entanto, existe consenso quanto à importância de alguns ácidos graxos para o crescimento, sobrevivência e saúde dos peixes.

### 2.2.1 Definição de ácidos graxos e de essencialidade

Os lipídeos são biomoléculas que exibem grande variedade estrutural. Moléculas distintas, como as gorduras e óleos, fosfolipídios, esteroides e carotenoides, que diferem grandemente tanto em suas estruturas como em suas funções, são agrupadas em um mesmo grande grupo, sob a designação de lipídeos. Essa classe heterogênea apresenta como ponto comum uma baixa solubilidade em água.

Os triacilgliceróis, principais constituintes dos óleos e gorduras, representam a classe mais expressiva dos lipídeos neutros presentes nos alimentos. Os triacilgliceróis são constituídos de três moléculas de ácidos graxos, esterificadas aos grupos hidroxila do glicerol.

Com base nos padrões estabelecidos pela IUPAC (*International Union of Physical and Applied Chemists*) a fórmula dos ácidos graxos e seu nome sistemático são dados pelo número de átomos de carbono na cadeia, número de insaturações e posição da primeira insaturação tomada a partir da extremidade metílica, de forma que, um ácido graxo contendo 18 carbonos e uma insaturação no nono carbono é designado por 18:1n-9 ou cis-9-octadecenoico, e um ácido graxo contendo 20 carbonos e quatro insaturações, sendo que a primeira ocorre

no carbono seis, por 20:4n-6 ou cis 5,8,11,14-eicosatetraenoico (*eicos* corresponde a 20 carbonos, tetraenoico 4 ligações enoicas). Alguns ácidos graxos possuem também um nome trivial associado a alguma característica do composto. No caso dos exemplos dados acima, o 18:1n-9 é também conhecido como ácido oleico, porque ocorre em abundância no óleo de oliva e o 20:4n-6 como araquidônico cujo nome deriva da palavra “amendoim”, em latim *arachis*. Na tabela 1 é apresentada a nomenclatura de alguns ácidos graxos.

Com relação ao número de insaturações, os ácidos graxos podem ser classificados como ácidos graxos saturados ou SAFA (*saturated fatty acids*) caso não possuam duplas ligações em sua cadeia; ácidos graxos monoinsaturados ou MUFA (*monounsaturated fatty acids*), que possuem apenas uma insaturação; ácidos graxos poli-insaturados ou PUFA (*polyunsaturated fatty acids*), que possuem duas ou mais insaturações e os ácidos graxos altamente insaturados ou HUFA (*highly unsaturated fatty acids*), que possuem quatro ou mais insaturações (BRETT; MÜLLER-NAVARRA, 1997). A distinção entre PUFA e HUFA ainda é controversa, mas geralmente, nos trabalhos relacionados à aquicultura, se usa o termo HUFA para designar os ácidos graxos com 20 ou mais carbonos como o docosaexaenoico (DHA), eicosapentaenoico (EPA) e araquidônico (ARA) e o termo PUFA geralmente está associado aos ácidos de 18 carbonos como linolênico e linoleico.

De maneira geral, as duplas ligações são introduzidas nos ácidos graxos de 16 ou 18 carbonos. Portanto, um ácido graxo insaturado pode ser produzido a partir de um ácido graxo saturado, introduzindo-se duplas ligações por intermédio de enzimas específicas denominadas dessaturases. A posição da insaturação é determinada pelo tipo de dessaturase, que possui uma distribuição bastante diferenciada entre vegetais superiores, inferiores, fungos e animais (BRETT; MÜLLER-NAVARRA, 1997).

<b>Fórmula</b>	<b>Nome comum</b>	<b>Nome sistemático</b>
8:0	Caprílico	Octanoico
10:0	Cáprico	Decanoico
12:0	Láurico	Dodecanoico
14:0	Mirístico	Tetradecanoico
14:1 n-5	Miristoleico	cis-9-tetradecenoico
16:0	Palmítico	Hexadecanoico
16:1	Palmitoleico	cis-9-hexadecenoico
18:0	Esteárico	Octadecanoico
18:1 n-9	Oleico	cis-9-Octadecenoico
18:2 n-6	Linoleico	9-12,octadecadienoico
18:2 n-9	Linolelaídico	trans-9,trans-12-Octadecadienoico
18:3 n-3	$\alpha$ - Linolênico	cis-9,12,15-Octadecatrienoico
18:3 n-6	$\gamma$ - Linolênico	cis-6,9,12-Octadecatrienoico
18:4 n-3	Estearidônico	cis-6,9,12,15-Octadecatetraenoico
20:0	Araquídico	Eicosanoico
20:1 n-9	Gondoico	cis-11-Eicosenoico
20:2		cis-11,14-Eicosenoico
20:3		cis-11,14,17-Eicosatrienoico
20:3 n-6	Homo- $\gamma$ -Linolênico	cis-8,11,14-Eicosatrienoico
20:4 n-6	Araquidônico	cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoico
20:5 n-3	Eicosapentaenoico	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentanoico
21:0	Heneicosanoico	Heneicosanoico
22:0	Docosanoico	Docosanoico
22:1 n-9	Erúcico	cis-13-Docosenoico
22:2		cis-13,16-Docosadienoico
22:4 n-6	Adrênico	cis-7,10,13,16-Docosatetraenoico
22:5	Docosapentaenoico	cis-7,10,13,16,19-Docosapentaenoico
22:6 n-3	Docosaexaenoico	cis-4,7,10,13,16,19-Docosaexaenoico
23:0	Tricosanoico	Tricosanoico
24:0	Lignocérico	Tetracosenoico
24:1 n-9	Nervônico	cis-15-tetracosenoico

Quadro 1 Nomenclatura dos ácidos graxos

Ácidos graxos essenciais são aqueles que não podem ser sintetizados ou não são produzidos em quantidade adequada pelos animais para suprir a demanda de seus processos fisiológicos. Como os outros animais, os peixes não são capazes de formar os ácidos linoleico e linolênico a partir do ácido oleico, devido à ausência das enzimas  $\Delta 12$  e  $\Delta 15$  dessaturase. Logo, os ácidos graxos de 18C, das séries n-3 e n-6, em princípio, são obtidos a partir dos vegetais (RAINUZZO; REITAN; OLSEN, 1997). Alguns autores consideram três os ácidos graxos essenciais: EPA, DHA e araquidônico. Não há indícios, em peixes, de que os ácidos graxos linoleico e linolênico possuam funções fisiológicas específicas que não seja a produção dos ácidos graxos essenciais que derivam deles (TOCHER; DICK, 2000).

Uma distinção é comumente feita entre as espécies de água doce e as espécies de água salgada, quanto à sua habilidade de converter o ácido linoleico em araquidônico (ARA) e o  $\alpha$ -linolênico nos n-3HUFA eicosapentaenoico (EPA) e docosaexaenoico (DHA) (BELL; SARGENT, 2003; SARGENT; MCCEVOY; BELL, 1997; TOCHER, 2003). Espécies marinhas, como o *Scophthalmus maximus* e o *Sparus aurata*, possuem baixa atividade das enzimas C18-C20 elongase e  $\Delta 5$  dessaturase, respectivamente, impedindo que consigam realizar tal conversão e, portanto, os peixes marinhos dependem completamente da dieta para suprir a demanda do organismo de EPA, DHA e ARA (SARGENT et al., 1999a, 1999b; TOCHER, 2003).

Foi identificado e descrito em *zebrafish* um transcrito com alta homologia às elongases presentes em mamíferos contendo os mesmos elementos essenciais básicos, que em teoria, pode indicar a habilidade de realizar o alongamento de cadeia necessário para produzir os HUFA (AGABA et al., 2004).

### 2.2.2 Síntese de ácidos graxos poli-insaturados

A capacidade de introduzir insaturações em um MUFA para formar um PUFA varia consideravelmente entre os reinos animal e vegetal. As algas e os vegetais inferiores são capazes de sintetizar C20-22 HUFAs das séries n-3 e n-6, enquanto que os vegetais superiores produzem apenas os C18 PUFAs correspondentes. Os animais não possuem a capacidade de gerar as séries n-3 e n-6 “de novo” e necessitam obtê-las através da dieta. Isso ocorre porque os vertebrados não possuem as enzimas  $\Delta 12$   $\Delta 15$  necessárias para sintetizar linoleico e linolênico a partir de oleico (TOCHER et al., 2006).

Nos mamíferos e nos peixes de água doce, o fígado é responsável por grande parte da produção de EPA, DHA e ARA. A maioria das reações acontece na fração microssomal e as mesmas enzimas que atuam na série n-3 atuam também na n-6. A capacidade dos animais em converter C18 PUFA em C20-22 HUFA está correlacionada com a atividade das enzimas acil-dessaturase e elongase microssomais. A síntese de EPA a partir de 18:3n-3 ocorre por dessaturação na posição  $\Delta 6$ , seguida por um alongamento de dois carbonos na cadeia e posteriormente, por mais uma dessaturação na posição  $\Delta 5$ . Já na síntese do DHA, o 22:5n-3 sofre alongação, se transformando em 24:5n-3 que, por sua vez, é convertido, por dessaturação  $\Delta 6$ , em 24:6n-3. Por meio de reações de encurtamento de cadeia nos peroxissomas, o 24:6n-3 é convertido em 22:6n-3. Esse encurtamento de cadeia é a única reação que ocorre no espaço extramicrossomal (BELL; SARGENT, 2003; LUTHRIA; MOHAMMED; SPRECHER, 1996; SPRECHER, 2000; TOCHER, 2003). No *zebrafish*, tanto a dessaturação  $\Delta 5$  quanto à  $\Delta 6$  estão relacionadas com a atuação de uma única proteína, produto de um único gene, em contraste com o que se observa em outros sistemas estudados (HASTINGS et al., 2001).



O aumento linear na cadeia dos ácidos graxos, denominado alongação ou alongamento, envolve a condensação do ácido graxo ativado com o malonil-CoA e reações de acil-redução, que em essência, são o reverso de uma  $\beta$ -oxidação. Variações na capacidade de biossíntese de HUFA podem também estar correlacionadas com a atividade das elongases, como ocorre no *Scophthalmus maximus*, onde se constatou uma baixa atividade na C18-20 elongase (GHIONI et al., 1999).

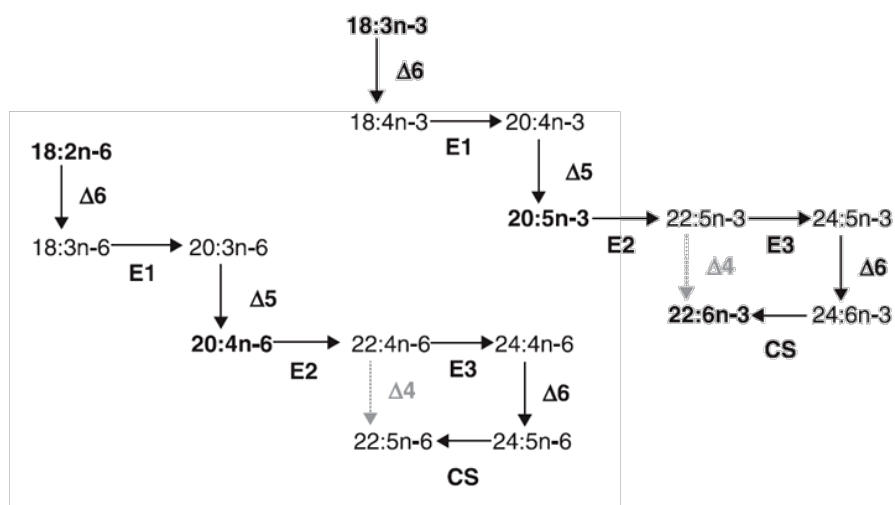


Figura 3 Rotas de alongação e dessaturação de C-18 para produzir HUFA em hepatócitos de peixes

Fonte: Glencross (2009).

Nota: As rotas marcadas em cinza são as que não possuem comprovação. Os ácidos graxos principais estão marcados em negrito.  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$  e  $\Delta 4$  representam as reações mediadas pelas ácido graxo dessaturases microsossomais. E1, E2 e E3 representam as reações mediadas pela elongase microsossomal e CS representa redução de cadeia

### 2.2.3 Digestão de lipídeos em peixes

O trato digestivo do *zebrafish* possui, basicamente, os mesmos elementos essenciais que compõem o sistema digestivo dos mamíferos. É formado por um intestino único, desempenha as funções do estômago e intestino dos mamíferos, esôfago, fígado, vesícula biliar e pâncreas. Aos cinco dias pós-fertilização (dpf) todas essas estruturas se encontram desenvolvidas nas larvas de *zebrafish* (RUBINSTEIN; HO; FARBER, 2005).

Os triglicerídeos são a principal classe de lipídeo encontrada nas dietas de peixe. No trato digestivo dos mamíferos, a hidrólise do triglicerol é conduzida, majoritariamente, por duas enzimas pancreáticas, o sistema lipase-colipase (EC 3.1.1.3) e a lipase ativada por sais biliares (EC 3.1.1.1) (TOCHER, 2003).

A atividade lipolítica em peixes geralmente se concentra na parte proximal do intestino e cecos pilóricos (se presentes). No entanto algumas espécies como *Scophthalmus maximus* e *Pleuronectes platessa* possuem uma maior atividade lipolítica na parte distal do intestino (OLSEN; RINGO, 1997). A principal fonte de enzimas lipolíticas são as células acinares do pâncreas exócrino (KURTOVIC et al., 2009). As colípases são secretadas como pró-enzimas e são ativadas no lúmen intestinal e as lípases são secretadas na forma ativa. A cascata de ativação da colipase inicia com a ação da enteroquinase que é produzida e secretada pelas células intestinais. Existem diversos relatos onde foi constatada uma pequena atividade lipolítica no estômago de peixes como *Arctic charr* (*Salvelinus alpinus*) e bacalhau (OLSEN; RINGO, 1997), no entanto, a ação lipolítica do estômago teria uma participação marginal no processo digestivo dos lipídeos.

Não se sabe ao certo qual enzima lipolítica predomina nos peixes, no entanto, segundo Kurtovic et al. (2009), as lípases digestivas podem ser tanto do

tipo lipase pancreática colipase-dependente (PL) ou carboxil-ester lipase dependente de sais biliares (CEL) e que a PL predomina nas espécies de água doce enquanto a CEL é mais presente em espécies marinhas.

O estudo dessas enzimas se torna bastante complicado devido à natureza difusa do pâncreas nos peixes, no entanto, a quantidade e a atividade das diferentes lipases pancreáticas secretadas parecem diferir de espécie para espécie e também de acordo com as preferências alimentares (KROGDAHL; SUNDBY, 1999).

Para que a digestão dos lipídeos se processe de maneira eficiente a presença de substâncias emulsificantes se faz necessária. No intestino os sais biliares emulsionam finamente os lipídeos, aumentando sua superfície de exposição por meio da redução da tensão superficial. Dessa maneira se favorece a união da colipase, que possui um sítio específico de união para a lipase (RUST, 2002).

#### **2.2.4 Absorção de lipídeos**

A absorção de várias classes de lipídeos pelos peixes ainda precisa ser elucidada, no entanto o que se conhece até o presente momento leva a crer que este é um mecanismo relativamente conservado nos vertebrados. Os ácidos graxos liberados das micelas são absorvidos nos enterócitos por difusão direta ou transporte facilitado. O envolvimento de transportadores descritos para mamíferos ainda precisa ser comprovado em peixes, no entanto, transcritos da proteína ligadora de ácidos graxos intestinais (I-FABP) foram encontrados em *zebrafish* e carpa comum (ANDRE et al., 2002; CONCHA et al., 2002). A digestão e a absorção dos lipídeos ocorrem principalmente nas regiões proximais do intestino e nos cecos pilóricos, quando presentes (DENSTADLI et al., 2004; HERNANDEZ-BLAZQUEZ et al., 2006; RØSJIØ et al., 2000) e a forma como

ocorre é influenciada pela classe de lipídeo, pelo comprimento da cadeia e grau de insaturação. Ácidos graxos de cadeia curta e média, por possuírem maior hidrossolubilidade, são prontamente absorvidos na parte mais proximal do intestino (DENSTADLI et al., 2004; RØSJØ et al., 2000) ao passo que os ácidos graxos saturados de cadeia longa, por terem elevada hidrofobicidade e baixa solubilidade micelar, chegam com mais dificuldade a borda em escova dos enterócitos e, portanto, não são tão prontamente absorvidos. Ácidos graxos livres (não esterificados) e fosfatidilcolina são absorvidos de forma mais rápida que os triglicerídeos (MORAES; PIQUERAS; BISHOP-BAILEY, 2006; OXLEY et al., 2007).

As gotículas de lipídeos absorvidos do intestino se acumulam no espaço supranuclear dos enterócitos, onde posteriormente são reesterificados em triacilglicerol e organizados em lipoproteínas (DENSTADLI et al., 2004; HERNANDEZ-BLAZQUEZ et al., 2006; OLSEN et al., 1999).

### **2.2.5 Transporte extracelular de lipídeos**

Assim como nos mamíferos, nos peixes o transporte de lipídios e outros compostos lipossolúveis do intestino para os tecidos periféricos se dão, majoritariamente, por intermédio das lipoproteínas. Os peixes apresentam uma organização similar à encontrada nos mamíferos para transportar os lipídeos e compartilham com os últimos, as mesmas classes de lipoproteínas, no entanto, no *zebrafish*, assim como nos demais teleosteos estudados, a lipoproteína predominante é o HDL (*High-density lipoprotein*) (BABIN; VERNIER, 1989; SHERIDAN, 1988).

O transporte de lipídeos para os tecidos via lipoproteínas está resumido na figura 4. Existem rotas diferenciadas pelas quais ocorre o transporte exógeno (de origem dietética) e endógeno (de origem hepática) de lipídeos. No entanto,

ambas as rotas compartilham a característica de que as lipoproteínas maiores dão origem às menores ao fornecer lipídeos aos tecidos por mecanismos receptores - dependentes.

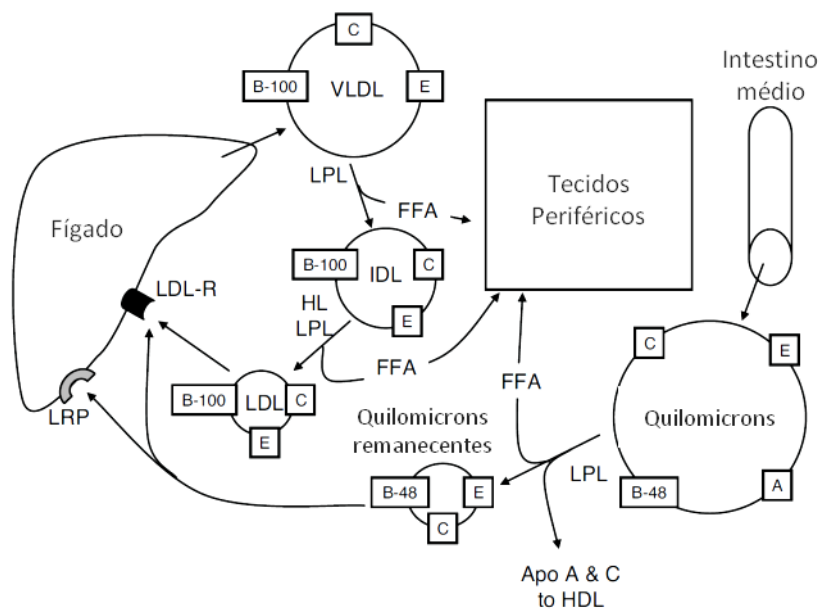


Figura 4 Resumo do transporte de lipídeos

Fonte: Davis e Wagganer (2006)

### 2.2.5.1 Transporte de lipídeos na rota exógena

Na rota exógena a apo B-48 é sintetizada pelas células intestinais e incorporada juntamente com triglicerídeos e outros lipídeos nos quilomícrons (CM). A proteína de transferência microssomal (MTP) responsável pela incorporação dos triacilgliceróis dentro das lipoproteínas se encontra conservada em *zebrafish* e se expressa na camada sincicial do vitelo, no intestino e no fígado (MARZA et al., 2005).

Apesar de estruturalmente não possuírem muita importância para os CM, as apoproteínas A-I e A-IV também são incluídas na formação dos CM. Uma vez na circulação, os CM recebem ainda, a partir dos HDL, as apoproteínas C-I, C-II, C-III, e E. A incorporação da apo C-II na estrutura do CM é essencial para viabilizar o catabolismo dos triglicerídeos que estão sendo transportados, um vez que, a mesma atua como coativador da enzima lipoproteína lípase (LPL). Essa enzima, que se situa unida à superfície luminal das células endoteliais dos capilares, por meio de pontes heparina-sulfato-proteoglicanos, hidrolisa os triglicerídeos nas posições *Sn-1* e *Sn-3* liberando os ácidos graxos para captação pelos tecidos adjacentes (principalmente tecido adiposo e tecido muscular), ou para se unirem à albumina e serem transportados pela circulação para outros tecidos, inclusive para o fígado. A LPL encontra-se bastante conservada entre os vertebrados e em peixes. Acredita-se que a transcrição dessa enzima sofra regulação pela condição nutricional e o estado fisiológico dos animais (SAERAVILA et al., 2005).

As informações sobre a função e regulação da LPL nos peixes são bastante escassas, mas alguns estudos evidenciaram que a atividade da LPL é mantida no fígado dos peixes adultos, fato que pôde ser confirmado posteriormente pela presença de quantidades substanciais de transcritos de LPL nos tecidos hepáticos de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (LINDBERG; OLIVECRONA, 2002) e *seabream* (*Pagrus major*) (LIANG; OKU; OGATA, 2002).

Nos mamíferos, a lípase hepática (HL) também desempenha essa função, no entanto, sua atividade não depende da coativação das apolipoproteínas como ocorre para a LPL. O produto remanescente da atuação da LPL contém colesterol, fosfolípidos, apolipoproteínas e uma quantidade de triglicerídeo consideravelmente menor que a inicial. A maioria das apo-A e parte das apo-C são transferidas para o HDL e o remanescente se torna disponível

para o catabolismo hepático. Isso pode ocorrer por endocitose via receptor de LDL ou por intermédio de uma proteína denominada LRP (*LDL-receptor related protein*). A apo E serve de ligante para esses receptores e a apo C-I inibe a endocitose mediada pela apo E, pelo receptor de LDL e LRP. A apo B-48 não é reconhecida pelos receptores hepáticos. Ao contrário do que ocorre para os mamíferos, a LPL se expressa no fígado de trutas adultas, indicando que possivelmente a LPL desempenha nesse órgão a mesma função da HL (LINDBERG; OLIVECRONA, 2002).

Em *zebrafish* os genes apo E (apolipoproteína E) e *apoA-I* (apolipoproteína A-I) já foram caracterizados e constatou-se que a expressão se mantém elevada durante o desenvolvimento do embrião. Constatou-se que ambos os genes se expressam na camada sincicial do vitelo, uma estrutura extraembrionária que desempenha diversas funções, como metabolismo de nutrientes, que posteriormente serão assumidas pelo fígado (BABIN et al., 1997).

#### **2.2.5.2 Transporte de lipídeos na rota endógena**

O transporte de colesterol e de triglicerídeos sintetizados no fígado (rota endógena) inicia com a liberação do VLDL (*Very-low-density lipoprotein*) que contém a apolipoproteína B-100, apo C-I, C-II, C-III, e E. A apo B-100 é uma das maiores proteínas conhecidas, possui uma massa de cerca de 550kDa e uma sequência de 4536 aminoácidos, a apo B-48 produzida no intestino é uma versão cerca de 48% menor da apo B-100, de origem hepática. Assim como ocorre com os CM, a apo C-II atua como coativadora da LPL na hidrólise dos triglicerídeos carregados pela VLDL. Após perder parte da carga de triglicerídeos, pela ação da LPL o VLDL passa a ser classificado como IDL (*Intermediate-density lipoprotein*) que continua a sofrer ação da LPL e da HL resultando na perda da

maior parte dos triglicerídeos e da apo E. A estrutura resultante passa a conter ésteres de colesterol como principal lipídeo e apo B-100 como principal apolipoproteína. A apo B-100 é reconhecida pelo receptor de LDL (*Low-density lipoprotein*) no fígado e em outros tecidos que internalizam a lipoproteína, tornando o colesterol disponível para incorporação na membrana celular ou então para síntese de esteroides (DAVIS; WAGGANER, 2006).

A relação entre a porcentagem de apo C-II e apo C-III é importante na regulação dos níveis plasmáticos de triglicerídeos e também de VLDL e LDL, uma vez que a apo C-II atua como cofator da LPL e a apo C-III inibe a ação desta enzima (DAVIS; WAGGANER, 2006).

De forma geral, os teleósteos são hiperlipidêmicos e hipercolesterolêmicos, quando comparados com os mamíferos. Após receber uma dieta rica em colesterol, o colesterol plasmático de *zebrafish* atingiu aproximadamente 20,7 mmol/L (800 mg/dL) que se assemelha ao obtido em experimentos com ratos, onde realizou-se o *knockdown* do gene do receptor de LDL (STOLETOV et al., 2009). O nível de insaturação dos ácidos graxos presentes nas lipoproteínas de peixe é bastante elevado. Na truta, por exemplo, mais de 60% dos ácidos graxos transportados são insaturados.

### 2.2.6 Eicosanoides

O termo “eicosanoide” denota uma abrangente família de compostos oxigenados oriundos de ácidos graxos HUFA de 20 carbonos, contendo de três a cinco *cis*-duplas ligações (20:3n-6, 20:4n-6 e 20:5n-3). A família dos eicosanoides pode ser dividida em três classes, que incluem os prostanoides (prostaglandinas e tromboxanos), que são gerados pela via da cicloxigenase; os leucotrienos e certos di e tri-hidroxiácidos, que são formados via lipoxigenase, e os epóxidos, oriundos da via do citocromo P-450 epoxigenase. Esses ácidos de



20C, geralmente, se encontram esterificados na posição *sn*-2 do glicerol dos fosfolipídios de membrana. O processo de liberação desses ácidos pode acontecer de duas formas distintas. Uma envolve a fosfolipase A2 e outra, que ocorre em duas etapas, envolve a fosfolipase C e a diacilglicerol lípase ou fosfolipase D (CALDER, 2006; LUO, 2006; SMITH, 1989).

Existem duas variações de cicloxigenase (COX): A COX-1, que ocorre na maioria das células, e a COX-2, que é induzida em processos inflamatórios. As COXs atuam sobre o araquidonato, produzindo endoperóxidos cíclicos. Estes podem dar origem a diferentes prostanoídes: PGI<sub>2</sub> (prostaciclina I<sub>2</sub>) TXA<sub>2</sub> (tromboxano A<sub>2</sub>), PGE<sub>2</sub> (prostaglandina E<sub>2</sub>), PGF<sub>2α</sub> (prostaglandina F<sub>2α</sub>) e PGD<sub>2</sub> (prostaglandina D<sub>2</sub>). A 5-lipoxigenase atua sobre o araquidonato, produzindo 5-HPETE (ácido hidroperoxieicosatetraenoico), que é convertido em leucotrieno LTA<sub>4</sub> por uma desidrase. O LTA<sub>4</sub> pode ser convertido para LTB<sub>4</sub> ou numa série de cistenil-leucotrienos, LTC<sub>4</sub> LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>, que possuem aminoácidos incorporados em sua estrutura (BRASH, 2001; SMITH, 1989).

Por meio de rotas metabólicas semelhantes às percorridas pelo araquidonato, o ácido eicosapentaenoico pode gerar as séries 3 de prostanoídes (PGI<sub>3</sub>, TXA<sub>3</sub>, TXB<sub>3</sub>, PGD<sub>3</sub>, PGE<sub>3</sub>, PGF<sub>3</sub>) e 5 de leucotrienos (LTA<sub>5</sub>, LTB<sub>5</sub>, LTC<sub>5</sub>, LTD<sub>5</sub>, LTE<sub>5</sub>) que, em tese, possuem as mesmas funções que os produzidos pelo C20:4n-6, porém, os primeiros produzem efeitos muito mais brandos. Essa diferença entre a biopotência dos eicosanóides permite que a atuação destas substâncias seja regulada pela razão ARA/EPA nas membranas celulares (BRASH, 2001; RUBIN; LAPOSATA, 1992; SMITH, 1989).

### 2.2.7 Lipídeos e reprodução

A importância dos lipídeos na reprodução dos peixes cultivados ainda é pouco compreendida, isso se deve em parte à dificuldade de se conseguir uma

infraestrutura adequada para alojar um número representativo de reprodutores para condução dos experimentos. No entanto, sabe-se que os requerimentos nutricionais das matrizes não são os mesmos daqueles determinados para as fases iniciais do desenvolvimento. Também se pode afirmar que, como nos demais animais, diversos dos problemas encontrados nas fases iniciais do cultivo estão diretamente relacionados com a nutrição das matrizes (IZQUIERDO; FERNANDEZ-PALACIOS; TACON, 2001).

Comparações entre o desempenho reprodutivo de peixes cultivados e peixes em seu habitat natural têm apontado um fornecimento inadequado de HUFAs como um dos principais responsáveis pelo declínio dos índices reprodutivos observados nos animais em cativeiro. Em um estudo comparativo Seaborn et al. (2009) constataram que a composição dos ovos de *sea bass*, *Centropristis striata* cultivados possuíam níveis mais baixos de ARA e uma relação EPA/DHA menor do que a encontrada em animais selvagens e que isso impactava negativamente a qualidade dos ovos produzidos. Em um estudo semelhante, Salze et al. (2005) também apontaram os níveis mais elevados de ARA presente nos fosfolipídeos de ovos de bacalhau como responsável pela melhor qualidade dos ovos obtidos de peixes selvagens.

A deposição de ácidos graxos, especialmente os HUFAs, nas gônadas de peixe em preparação para a reprodução, mesmo quando estes ácidos se encontram deficientes na dieta, também é um indicativo da importância destes nutrientes para o processo reprodutivo (HAREL et al., 1994). De fato, existem diversos relatos que comprovam uma ação reguladora dos ácidos graxos da dieta das matrizes sobre a taxa de fertilização, taxa de eclosão, maturação dos oócitos e qualidade das larvas (BELL; SARGENT, 2003; JOHNSON, 2009; PATINO et al., 2003; SALZE et al., 2005; SORBERA et al., 2001; WILSON, 2009).

### 2.3 O papel do estradiol

Os hormônios esteroides são produzidos em células esteroidogênicas da adrenal, ovários, testículos e cérebro e são fundamentais para homeostase fisiológica e para o processo reprodutivo. Tanto a regulação aguda como a crônica da esteroidogênese se dão pela ação de hormônios tróficos do eixo hipotálamo-pituitária-gônadas, especialmente pelo hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), produzidos pela pituitária (STOCCO, 2001). A regulação aguda, que se caracteriza por respostas rápidas da ordem de minutos, se inicia pela mobilização e distribuição do colesterol da membrana externa da mitocôndria para membrana interna onde ele é metabolizado a pregnenolona pela enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol a citocromo P450<sub>scc</sub> (MILLER, 2007). A pregnenolona por sua vez servirá de substrato para a produção de todos os demais esteroides. A resposta crônica cuja atuação se observa após algumas horas, envolve o aumento da transcrição e da tradução dos genes que codificam as enzimas esteroidogênicas o que irá conferir a célula um aumento na capacidade de síntese (SIMPSON; WATERMAN, 1988).

O passo crítico da síntese dos hormônios esteroides é a transferência do colesterol para a membrana interna da mitocôndria onde se localiza a citocromo P450<sub>scc</sub>, que é mediado por proteínas ciclohexamida-sensíveis. Várias proteínas candidatas para essa função foram propostas, entre elas, a *StAR* (*steroidogenic acute regulatory protein*) é a que reúne o maior número de características de reguladora aguda (CLARK et al., 1994; DAVIS; GARREN, 1968; STOCCO; CLARK, 1996).

A *StAR* é uma proteína de 30kDa sintetizada primeiramente no citosol como um precursor de 37kDa em resposta à ativação da rota de sinalização celular da cAMP-proteínaquinase A. A *StAR* foi inicialmente descrita em 1983

(KRUEGER; ORME-JOHNSON, 1983), mas somente em 1994 pôde ser purificada, sequenciada e clonada (CLARK et al., 1994). Sabe-se que expressão da *StAR* é regulada pela ação de hormônios tróficos, no entanto, detalhes dos mecanismos moleculares dessa regulação ainda não são conhecidos. O envolvimento dessa proteína no transporte de colesterol foi evidenciado em diversos estudos clínicos. Pacientes sofrendo de hiperplasia lipóide adrenal, uma patologia onde virtualmente não ocorre síntese de esteroides e também estudos com linhagens de ratos transgênicos, onde a produção de *StAR* foi bloqueada, forneceram indícios da relação dessa proteína com a esteroidogênese (CARON et al., 1997; LIN et al., 1995).

Após a internalização do colesterol pela *StAR* e sua conversão à pregnenolona pela citocromo P450<sub>scc</sub>, ocorrem outros processos de clivagem que seguem duas rotas distintas. A pregnenolona pode ser convertida em progesterona, pela 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -*hydroxysteroid dehydrogenase*) ou em 17-hidroxipregnenolona pela 17 $\alpha$ -hidroxilase/ citocromo P450 c17,20-liase (NAGAHAMA, 1995; STOCCO, 2001). O destino metabólico da progesterona e da 17-hidroxipregnenolona depende do tecido em que a síntese está ocorrendo e da espécie em questão. No entanto, nas gônadas dos peixes, o metabolito ativo, produzido no fim da rota, é a 11-cetotestosterona (11-KT) nos machos e o 17 $\beta$ -estradiol (E2) nas fêmeas.

Estudos feitos em diferentes vertebrados, inclusive mamíferos (ABAYASEKARA; BAND; COOKE, 1990; ROMANELLI et al., 1995; WANG; LEUNG, 1988), aves (JOHNSON; TILLY, 1990) e peixes (KRAAK; CHANG, 1990; MERCURE; KRAAK, 1995, 1996; WADE; KRAAK, 1993) demonstraram que os HUFAs, especialmente o ARA, podem modular a produção de esteroides e que isso ocorre por diferentes rotas, por exemplo, a síntese da *StAR* é regulada a nível transcrricional, pela liberação do ARA dos fosfolipídios da membrana (WANG et al., 2000). Foi demonstrado também que

o ARA pode estimular a produção de esteroides sexuais nas gônadas, através de sua conversão em prostaglandina E2 (PGE2) e também aumentando a produção de cAMP em *goldfish* (*Carassius auratus*) e truta arco-íris (MERCURE; KRAAK, 1995; WADE; KRAAK, 1993).

Nos vertebrados, de maneira geral, o estradiol (E2) está relacionado com diversos processos fisiológicos que vão desde o desenvolvimento embrionário até a fase adulta. O desenvolvimento e a manutenção do sistema reprodutivo dos peixes, tanto em machos como em fêmeas, ocorre sob a influência do estradiol. Nas espécies ovíparas, o E2 é responsável pelo controle da vitelogênese no fígado. Nas gônadas, o estradiol desempenha um papel central na diferenciação sexual e na esteroidogênese durante o ciclo reprodutivo (DORRINGTON; BENDELL; KHAN, 1993; GUIGUEN et al., 1999).

Além do papel-chave que o E2 desempenha no funcionamento do eixo reprodutivo, as pesquisas com estrógenos ganharam bastante destaque no campo da toxicologia, devido à capacidade de alguns poluentes, que se configuram com disruptores endócrinos, mimetizarem a ação do estradiol. Consequentemente, o conhecimento dos mecanismos moleculares através dos quais os estrógenos atuam passou a ser fundamental para compreender o impacto desses compostos sobre a fisiologia reprodutiva dos peixes (MILLS; CHICHESTER, 2005).

O mais ativo estimulador da expressão do gene da vitelogenina (*vtg*) é o esteroide ovariano 17 $\beta$ -estradiol (E2), que é sintetizado sob a regulação do eixo Hipotálamo-pituitária-gônadas. Genomicamente, as ações dos estrógenos ocorrem principalmente pela mediação de receptores nucleares específicos para o estradiol (ERs). Acredita-se que o E2 se difunde para o interior das células e se liga aos ERs que se localizam no citosol ou no núcleo das células alvo. Após se ligarem, os ERs formam homo- ou heterodímeros que por sua vez, se ligam a sequência palindrômicas específicas, conhecidas como elemento de resposta a estrógenos (ERE) que se fazem presentes na região promotora dos genes

responsivos a estrógenos, resultando no recrutamento de coativadores ou corepressores, o que levará ao aumento ou a diminuição dos níveis de mRNA, alterando assim a concentração das proteínas codificadas por tais genes, culminando na ação fisiológica desse hormônio (KLINGE, 2001).

Os ERs também podem regular a expressão de genes sem se ligarem diretamente ao DNA, modulando a atuação de outras classes de fatores de transcrição, por meio de interações proteína-proteína no núcleo celular. Dessa maneira, o E2 consegue atuar em genes que não possuem ERE (BJÖRNSTRÖM; SJÖBERG, 2005; GOTTLICHER; HECK; HERRLICH, 1998). Algumas das ações mais imediatas do estradiol utilizam outro mecanismo de atuação, que não depende da rota genômica convencional, via ativação de RNA e síntese proteica. Essas ações são conhecidas como não genômicas e ocorrem por meio de ERs associados à membrana. Esse tipo de ação geralmente esta associada à ativação de várias cascatas de proteína-quinases (LOSEL; WEHLING, 2003).

Foram caracterizados em mamíferos e aves dois tipos predominantes de ER (ERa e ERb). Nos peixes, no entanto, ocorrem três tipos: receptor de estrógeno 1 receptor de estrógeno 2a e receptor de estrógeno 2b (sendo os nomes do genes correspondentes *esr1*, *ers2a*, *ers2b*) (MENUET et al., 2002).

Os efeitos do E2 nos genes-alvo são mediados pelos receptores de estradiol ERs que atuam como fatores de transcrição ligante-dependentes (COUSE; KORACH, 1999). Os receptores de estradiol possuem estrutura similar a outros membros da família de receptores nucleares (KUIPER et al., 1996).

## 2.4 Ontogenia do oócito e formação dos ovos de peixe

Nas espécies de peixes ósseos, as células germinais primordiais (PGC) indiferenciadas são produzidas em tecidos extragonadais e posteriormente se instalam nos ovários onde se desenvolvem em oogônias diferenciadas (RAZ, 2003, 2004). Células somáticas do tecido gonadal revestem as células germinais, destinadas a se tornar oócitos, dando origem aos folículos (MATOVA; COOLEY, 2001). Após divisões mitóticas sequenciais, a oogônia diploide sofre a primeira divisão meiótica se diferenciando em oócitos primários. A primeira divisão meiótica permanece paralisada no final da prófase, no estágio de diplóteno, por alguns dias ou meses, dependendo da espécie. Nessa etapa, as células germinais tetraploides acumulam mRNA, nutrientes e hormônios em um processo designado vitelogênese e completam a diferenciação de seu envelope celular. Ao final da vitelogênese, os oócitos primários retomam o processo meiótico. A primeira divisão meiótica gera duas células de tamanhos bem distintos, uma de tamanho bem reduzido que constitui o primeiro corpúsculo polar que irá se degenerar e uma célula de grandes dimensões, o oócito secundário. O oócito secundário se separa de seu envelope e é liberado no lúmen do ovário ou, no caso de algumas espécies, na cavidade abdominal. Nos teleósteos, assim como na maioria dos vertebrados, a segunda divisão meiótica do oócito secundário segue até a metáfase e é paralisada até que ocorra a fertilização (LE MENN; CERDÀ; BABIN, 2007).

Nos teleósteos, o ovo é o produto final do desenvolvimento e crescimento do oócito. Após a ovulação o ovo não recebe nutrientes, apenas água e íons presentes na água, portanto, todo o seu conteúdo, tanto genético quanto nutritivo, que são determinantes da qualidade do ovo, precisam ser incorporados durante o período em que se encontram no ovário. Nos vertebrados, grande parte das macromoléculas armazenadas nos ovos é

produzida nos oócitos em desenvolvimento. Muitas dessas moléculas fazem parte dos mecanismos de divisão celular pós-fertilização, como ribossomos, DNA e RNA polimerase, proteínas de histonas, fatores de transcrição e de tradução, etc. Um outro grupo de macromoléculas sintetizadas *in situ* são os mRNAs, que irão coordenar a síntese proteica até que o embrião seja capaz de assumir essa função. Outras moléculas como as proteínas do vitelo e do envoltório do ovo não são sintetizadas pelo oócito e precisam ser produzidas pelo fígado (LE MENN; CERDÀ; BABIN, 2007).

#### **2.4.1 Vitelogênese**

O termo vitelogênese geralmente descreve a incorporação de vitelogenina pelo oócito e a subsequente formação das proteínas do vitelo (LE MENN; CERDÀ; BABIN, 2007) No entanto, esse processo também engloba a assimilação de outros nutrientes como lipídeos e vitaminas (LUBZENS et al., 2010). Ao término desse processo o oócito estará apto à fertilização e reunirá itens fundamentais para o desenvolvimento do embrião, como mRNA materno, proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas e hormônios (LE MENN; CERDÀ; BABIN, 2007).

##### **2.4.1.1 Acúmulo de lipídeos**

Durante o processo de vitelogênese o oócito sofre um grande crescimento celular em função do influxo de proteínas e lipídeos provenientes do plasma. O transporte de lipídeos para o oócito é feito por lipoproteínas advindas do plasma, como VLDL e também pelas vitelogeninas (Vtgs). Na superfície dos oócitos, receptores de VLDL e de Vtg atuam mediando o processo de incorporação dos lipídeos, com auxílio de lipoproteína-lipases



ligadas à membrana. A lipólise dos triacilgliceróis dos VLDL e a re-esterificação dos ácidos graxos livres seriam responsáveis pela fração de lipídeos neutros presentes glóbulos de gordura. Os fosfolipídios necessários ao desenvolvimento do embrião são, provavelmente, transportados pela Vtg. A expressão de diversos genes relacionados ao reconhecimento de lipoproteínas na membrana ocorre durante os estágios iniciais da vitelogenese (LUCKENBACH et al., 2008).

#### **2.4.1.2 Vitelogeninas**

As Vtgs são fosfolipoglicoproteínas pertencentes à família das grandes proteínas transferidoras de lipídeos (LLTP), encontradas no plasma de fêmeas de todos os vertebrados ovíparos durante a vitelogênese. Sua síntese se dá no fígado sob regulação hormonal e o mais potente ativador da expressão do vtg é o hormônio esteroideal  $17\beta$ -estradiol (E2). Alguns tecidos extra-hepáticos como o intestino e os ovários também produzem vitelogenina, no entanto a produção no fígado contribui com a maior parte da proteína presente no plasma (BABIN et al., 2007; WANG et al., 2005).

Diferentes estudos indicam a existência de pelo menos três classes diferentes de Vtgs em teleósteos (VtgA, VtgB e VtgC) e todas são incorporadas no oócito. A sequência aminoacídica pode ser dividida em diferentes domínios linearmente dispostos em sequência. Iniciando pela extremidade n-terminal, a Vtg se organiza da seguinte forma: um peptídeo sinal, cadeia pesada da lipovitelina (LvH), fosfovítina (Pv), cadeia leve da lipovitelina, componente  $\beta$  e uma região C-terminal. Cada domínio origina uma proteína do vitelo (lipovitelinas, fosfovítinas, e  $\beta'$ ). A VtgC é similar a VtgA e VtgB, no entanto, não possui o domínio da fosfovítina. As Vtgs são fosforiladas e glicosiladas pós-traducionalmente e são secretadas na forma de dímeros na circulação (FINN, 2007).

### 3 CONCLUSÃO

As pesquisas com *zebrafish* têm contribuído com o avanço do conhecimento sobre o metabolismo lipídico. Estudos com grande número de reprodutores em condições controladas são extremamente dispendiosos, quando se trabalha com animais de grande porte, e o uso do *zebrafish* permite que os ensaios nutricionais sejam conduzidos de forma eficiente, com rigor científico, nas condições ideais, sem a necessidade de muito investimento. A relação entre os ácidos graxos essenciais e a reprodução é cada vez mais clara como têm sido evidenciado nas pesquisas, no entanto, os detalhes que governam esses efeitos ainda necessitam ser demonstrados. Alguns pontos básicos como a síntese dos hormônios esteroides, a vitelogenese, a qualidade dos ovos produzidos e o desenvolvimento embrionário foram abordados neste trabalho de tese e poderão servir de ponto de partida para o estudo pontual de cada rota envolvida e seus mecanismos moleculares.

## REFERÊNCIAS

- ABAYASEKARA, D. R. E.; BAND, A. M.; COOKE, B. A. Evidence for the involvement of phospholipase A-2 in the regulation of luteinizing hormone-stimulated steroidogenesis in rat testis leydig cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, New York, v. 70, n. 1, p. 147-154, Feb. 1990.
- AGABA, M. et al. Zebrafish cDNA encoding multifunctional fatty acid elongase involved in production of eicosapentaenoic (20:5n-3) and docosahexaenoic (22:6n-3) acids. **Marine Biotechnology**, New York, v. 6, n. 3, p. 251-261, June 2004.
- ANDRÉ, M. et al. Intestinal fatty acid binding protein gene expression reveals the cephalocaudal patterning during zebrafish gut morphogenesis. **The International Journal of Developmental Biology**, Palo Alto, v. 44, n. 2, p. 249-252, Feb. 2000.
- BABIN, P. J. et al. Both apolipoprotein E and A-I genes are present in a nonmammalian vertebrate and are highly expressed during embryonic development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 16, p. 8622-8627, 1997.
- \_\_\_\_\_. Molecular aspects of oocyte vitellogenesis in fish. In: BABIN, P. J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. (Ed.). **The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 39-76.
- BABIN, P. J.; VERNIER, J. M. Plasma lipoproteins in fish. **The Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 30, n. 4, p. 467-489, Dec. 1989.
- BELL, J. G.; SARGENT, J. R. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 218, n. 1/4, p. 491-499, Mar. 2003.
- BJORNSTROM, L.; SJOBERG, M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. **Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 19, n. 4, p. 833-842, Apr. 2005.
- BRASH, A. R. Arachidonic acid as a bioactive molecule. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 107, n. 11, p. 1339-1345, June 2001.

BRETT, M.; MÜLLER-NAVARRA, D. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. **Freshwater Biology**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 483-499, Dec. 1997.

BRIGGS, J. P. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. **American Journal Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative**, Bethesda, v. 282, n. 1, p. 3-9, Apr. 2002.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acides**, Edinburgh, v. 75, n. 3, p. 197-202, Sept. 2006.

CARON, K. M. et al. Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 115, p. 40-45, 1997.

CLARK, B. J. et al. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 45, p. 28314-28322, Nov. 1994.

CONCHA, M. I. et al. Specific binding of the endocytosis tracer horseradish peroxidase to intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) in apical membranes of carp enterocytes. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 293, n. 6, p. 541-550, Nov. 2002.

COUSE, J. F.; KORACH, K. S. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 20, n. 3, p. 358-417, June 1999.

DAHAN, R.; GEISLER, R. Learning from small fry: the Zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. **Marine Biotechnology**, New York, v. 8, n. 4, p. 329-345, Dec. 2006.

DAVIS, P. G.; WAGGANER, J. D. Lipid and lipoprotein metabolism. In: MOFFATT, R. J.; STAMFORD, B. (Ed.). **Lipid metabolism and health**. Davis: CRC, 2006. p. 47-60.

DAVIS, W. W.; GARREN, L. D. On the mechanism of action of adrenocorticotrophic hormone: the inhibitory site of cycloheximide in the pathway of steroid biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 243, p. 5153-5157, 1968.

DENSTADLI, V. et al. Lipid absorption in different segments of the gastrointestinal tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 240, n. 1/4, p. 385-398, Oct. 2004.

DORRINGTON, J. H.; BENDELL, J. J.; KHAN, S. A. Interactions between FSH, estradiol-17 beta and transforming growth factor-beta regulate growth and differentiation in the rat gonad. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 44, n. 4/6, p. 441-447, Mar. 1993.

FINN, R. N. The maturational disassembly and differential proteolysis of paralogous vitellogenins in a marine pelagophil teleost: a conserved mechanism of oocyte hydration. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 76, n. 6, p. 936-948, June 2007.

GHIONI, C. et al. Low C<sub>18</sub> to C<sub>20</sub> elongase activity and limited conversion of stearidonic acid, 18:4(*n*-3), to eicosapentanoic acid, 20:5(*n*-3), in a cell line from the turbot, *Schophthalmus maximus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, Alberta, v. 1437, n. 2, p. 170-181, Feb. 1999.

GLENCROSS, B. D. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. **Reviews in Aquaculture**, Tokyo, v. 1, n. 2, p. 71-124, June 2009.

GOTTLICHER, M.; HECK, S.; HERRLICH, P. Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. **Journal of Molecular Medicine**, Amsterdam, v. 76, n. 7, p. 480-489, June 1998.

GUIGUEN, Y. et al. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 54, n. 2, p. 154-162, Sept. 1999.

HAREL, M. et al. The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead sea bream *S. aurata* females and subsequent effects on egg composition and egg quality. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 72, n. 1, p. 45-58, Jan. 1994.

HASTINGS, N. et al. A vertebrate fatty acid desaturase with delta 5 and delta 6 activities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 25, p. 14304-14309, Nov. 2001.

HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. et al. Fat absorptive processes in the intestine of the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844). **Polar Biology**, New York, v. 29, n. 10, p. 831-836, Oct. 2005.

IZQUIERDO, M. S.; FERNANDEZ-PALACIOS, H.; TACON, A. G. J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1, p. 25-42, Mar. 2001.

JOHNSON, A. L.; TILLY, J. L. Arachidonic acid inhibits luteinizing hormonestimulated progesterone production in hen granulosa cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 42, n. 3, p. 458-464, Mar. 1990.

JOHNSON, R. B. Lipid deposition in oocytes of teleost fish during secondary oocyte growth. **Reviews in Fisheries Science**, Tokyo, v. 17, n. 1, p. 78-89, Feb. 2009.

KLINGE, C. M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 14, p. 2905-2919, Apr. 2001.

KRAAK, G. van der; CHANG, J. P. Arachidonic acid stimulates steroidogenesis in goldfish preovulatory ovarian follicles. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 77, n. 2, p. 221-228, Feb. 1990.

KROGDAHL, A.; SUNDBY, A. Characteristics of pancreatic function in fish. In: PIERZYNOWSKI, S. G.; ZABIELSKI, R. (Ed.). **Biology of the pancreas in growing animals**. Amsterdam: Elsevier Science, 1999. p. 437-458.

KRUEGER, R. J.; ORME-JOHNSON, N. R. Acute adrenocorticotrophic hormone stimulation of adrenal corticosteroidogenesis: discovery of a rapidly induced protein. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 258, n. 16, p. 159-167, Aug. 1983.

KUIPER, G. G. et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 12, p. 5925-5930, June 1996.

KURTOVIC, I. et al. Lipases from mammals and fishes. **Reviews in Fisheries Science**, New Jersey, v. 17, n. 1, p. 18-40, Mar. 2009.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 269, n. 1, p. 1-20, Apr. 2007.

LE MENN, J.; CERDÀ, P. J.; BABIN, P. J. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In: BABIN, P. J. (Ed.). **The fish oocyte: from basic studies to biotechnological application**. Wageningen: Springer, 2007. p. 1-37.

LIANG, X. F.; OKU, H.; OGATA, H. Y. The effects of feeding condition and dietary lipid level on lipoprotein lipase gene expression in liver and visceral adipose tissue of red sea bream *Pagrus major*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 131, n. 2, p. 335-342, Feb. 2002.

LIN, D. et al. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. **Science**, New York, v. 267, n. 5205, p. 1828-1831, Mar. 1995.

LINDBERG, A.; OLIVECRONA, G. Lipoprotein lipase from rainbow trout differs in several respects from the enzyme in mammals. **Gene**, Amsterdam, v. 292, n. 1/2, p. 213-223, June 2002.

LONG, Q. et al. GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene. **Development**, Cambridge, v. 124, n. 20, p. 4105-4111, Oct. 1997.

LOSEL, R.; WEHLING, M. Nongenomic actions of steroid hormones. **Nature Reviews of Molecular Cell Biology**, London, v. 4, n. 1, p. 46-56, Jan. 2003.

LUBZENS, E. et al. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 165, n. 3, p. 367-389, Feb. 2010.

LUCKENBACH, J. A. et al. Identification of differentially expressed ovarian genes during primary and secondary oocyte growth in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 6, n. 1, p. 2-16, Feb. 2008.

LUO, M. Metabolism of arachidonic acid to eicosanoids within the nucleus. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1761, n. 5/6, p. 618-625, May/June 2006.

LUTHRIA, D. L.; MOHAMMED, B. S.; SPRECHER, H. Regulation of the biosynthesis of 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, n. 27, p. 16020-16025, July 1996.

MARZA, E. et al. Developmental expression and nutritional regulation of a zebrafish gene homologous to mammalian microsomal triglyceride transfer protein large subunit. **Development Dynamics**, New York, v. 232, n. 2, p. 506-518, Feb. 2005.

MATOVA, N.; COOLEY, L. Comparative aspects of animal oogenesis. **Developmental Biology**, San Diego, v. 231, n. 2, p. 291-320, Mar. 2001.

MENUET, A. et al. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, n. 6, p. 1881-1892, June 2002.

MERCURE, F.; KRAAK, G. van der. Inhibition of gonadotropin-stimulated ovarian steroid production by polyunsaturated fatty acids in teleost fish. **Lipids**, Champaign, v. 30, n. 6, p. 547-554, June 1995.

\_\_\_\_\_. Mechanisms of action of free arachidonic acid on ovarian steroid production in the goldfish. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 102, n. 1, p. 130-140, Apr. 1996.

MILLER, W. L. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1771, n. 6, p. 663-676, June 2007.

MILLS, L. J.; CHICHESTER, C. Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 343, n. 1, p. 1-34, 2005.

MORAES, L. A.; PIQUERAS, L.; BISHOP-BAILEY, D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, New York, v. 110, n. 3, p. 371-385, Mar. 2006.

NAGAHAMA, Y. et al. Regulation of oocyte growth and maturation in fish. **Current Topics in Developmental Biology**, New York, v. 30, n. 1, p. 103-145, Jan. 1995.



OLSEN, R. E. et al. Lipid digestibility and ultrastructural changes in the enterocytes of Arctic char (*Salvelinus alpinus L.*) fed linseed oil and soybean lecithin. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 35-44, Jan. 1999.

OLSEN, R. E.; RINGO, E. Lipid digestibility in fish: a review. **Recent Research Developments in Lipids, Research**, Trivandrum, v. 21, n. 1, p. 199-265, 1997.

OXLEY, A. et al. Sn-2-monoacylglycerol, not glycerol, is preferentially utilised for triacylglycerol and phosphatidylcholine biosynthesis in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) intestine. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, New York, v. 146, n. 1, p. 115-123, Jan. 2007.

PATINO, R. et al. Role of arachidonic acid and protein kinase C during maturation-inducing hormone-dependent meiotic resumption and ovulation in ovarian follicles of Atlantic croaker. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 68, n. 2, p. 516-523, Feb. 2003.

RAINUZZO, J. R.; REITAN, K. I.; OLSEN, Y. The significance of lipids at the early stages of marine fish: a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 155, n. 1/4, p. 103-105, Sept. 1997.

RAZ, E. Guidance of primordial germ cell migration. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 16, n. 2, p. 169-173, Apr. 2004.

\_\_\_\_\_. Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 4, n. 4, p. 690-700, Sept. 2003.

ROMANELLI, F. et al. Arachidonic acid and its metabolites effects on testosterone production by rat leydig cells. **Journal of Endocrinological Investigation**, Milano, v. 18, n. 3, p. 186-193, Mar. 1995.

RØSJØ, C. et al. Lipid digestibility and metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed medium-chain triglycerides. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 190, n. 1, p. 65-76, Jan. 2000.

RUBIN, D.; LAPOSATA, M. Cellular interactions between n-6 and n-3 fatty acids: a mass analysis of fatty acid elongation/dessaturation, distribution among complex lipids, and conversion to eicosanoids. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 33, n. 10, p. 1431-1440, Oct. 1992.

RUBINSTEIN, A. L.; HO, S. Y.; FARBER, S. A. Zebrafish model of lipid metabolism for drug discovery in unraveling lipid metabolism with microarrays. In: BERGER, A.; ROBERTS, M. (Ed.). **Unravelling lipid metabolism with microarrays**. New York: M. Dekker, 2005. p. 423-432.

RUST, M. B. Nutritional physiology. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. (Ed.). **Fish nutrition**. 3<sup>rd</sup> ed. London: Academic, 2002. p. 367-452.

SAERA-VILA, A. et al. Molecular characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) lipoprotein lipase: transcriptional regulation by season and nutritional condition in skeletal muscle and fat storage tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, New York, v. 142, n. 2, p. 224-232, Oct. 2005.

SALZE, G. et al. Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, n. 15, p. 1488-1499, Nov. 2005.

SARGENT, J. R. et al. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 179, n. 1/4, p. 217-229, Sept. 1999a.

\_\_\_\_\_. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 177, n. 1/4, p. 191-199, July 1999b.

SARGENT, J. R.; MCCEVOY, L. A.; BELL, J. G. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 155, n. 1/4, p. 117-127, Sept. 1997.

SARGENT, J. R.; TOCHER, D. R.; BELL, J. G. The lipids. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. (Ed.). **Fish nutrition**. 3<sup>rd</sup> ed. San Diego: Elsevier Science, 2002. p. 181-257.

SEABORN, G. T. et al. Comparative fatty acid composition of eggs from wild and captive black sea bass, *Centropristis striata* L. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 40, n. 6, p. 656-668, Apr. 2009.

SHERIDAN, M. A. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, New York, v. 90, n. 4, p. 679-690, 1988.

SIMPSON, E. R.; WATERMAN, M. R. Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 50, p. 427-440, 1988.

SMITH, W. L. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. **Biochemical Journal**, London, v. 259, n. 2, p. 315-324, Apr. 1989.

SORBERA, L. A. et al. Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in a marine teleost, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 64, n. 1, p. 382-389, Jan. 2001.

SPRECHER, H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, Budapest, v. 1486, n. 2/3, p. 219-231, 2000.

STEINKE, D.; SALZBURGER, W.; MEYER, A. Novel relationships among ten fish model species revealed based on a phylogenomic analysis using ESTs. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 62, n. 6, p. 772-784, May 2006.

STOCCO, D. M. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 63, p. 193-213, 2001.

STOCCO, D. M.; CLARK, B. J. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 17, n. 3, p. 221-244, June 1996.

STOLETOV, K. et al. Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish. **Circulation Research**, Baltimore, v. 104, n. 8, p. 952-960, Mar. 2009.

TOCHER, D. R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. **Reviews in Fisheries Science**, Boca Raton, v. 11, n. 2, p. 107-184, Feb. 2003.

TOCHER, D. R.; DICK, J. R. Essential fatty acid deficiency in freshwater fish: the effects of linoleic,  $\alpha$ -linolenic,  $\gamma$ -linolenic and stearidonic acids on the metabolism of [1- $^{14}$ C]18:3n-3 in a carp cell culture model. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 22, n. 1, p. 67-75, Jan. 2000.

TOCHER, D. R. et al. Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish: cloning, functional characterisation, and nutritional regulation of fatty acyl delta 6 desaturase of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Lipids**, Champaign, v. 41, n. 11, p. 1003-1016, Nov. 2006.

UNIVERSITY OF OREGON. **The Zebrafish model organism database**. Disponível em: <<http://zfin.org>>. Acesso em: 24 mar. 2012.

WADE, M. G.; KRAAK, G. van der. Arachidonic acid and prostaglandin E2 stimulate testosterone production by goldfish testis in vitro. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 90, n. 1, p. 109-118, Feb. 1993.

WANG, H. et al. Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*. **Gene**, Amsterdam, v. 356, n. 1, p. 91-100, Jan. 2005.

WANG, J.; LEUNG, P. C. Role of arachidonic acid in luteinizing hormone-releasing hormone action: stimulation of progesterone production in rat granulosa cells. **Endocrinology**, Baltimore, v. 122, n. 3, p. 906-911, Mar. 1988.

WANG, X. et al. The role of arachidonic acid in steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory (StAR) gene and protein expression. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 26, p. 20204-20209, June 2000.

WILSON, R. Dietary effects of n-3 highly unsaturated fatty acid levels on egg and larval quality, and the fatty acid composition of the eggs of Chilean flounder *Paralichthys adspersus* broodstock. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 40, n. 12, p. 1400-1409, Dec. 2009.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGO**

**ARTIGO 1 Differential regulation of reproductive parameters by dietary fatty acids in zebrafish:** effects on ovary composition, estradiol level, embryonic development, and eclosion rate

Felipe G. Araújo, Daniel Okamura, Priscila Vieira e Rosa, Monica R. Ferreira, Luis David Solis Murgas, Rilke Tadeu Fonseca de Freitas

ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA THERIOGENOLOGY

## ABSTRACT

The role of lipids in various aspects of reproduction has been investigated in different species, but there is still little information on how these nutrients can influence zebrafish reproduction. To study some parameters related to reproductive successes, such as gonadal composition, oestradiol level and embryonic development, a 5 month feeding trial was conducted using olive (OLV), linseed (LIN), fish (FIS) and corn (CRN) oil to compose four isonitrogenous and isoenergetic experimental diets. The levels of EPA, ARA and especially DHA found in ovaries were higher than in the carcass for all diets, showing a possible preferential accumulation of these HUFAs in the ovary during the reproductive period. The FIS fed group had higher oestradiol levels ( $367.51 \pm 31.37\text{pg/mg}$ ) than the others. Embryos with 8-9 hours post-fertilisation (hpf) from fish that received the CRN diet were more developed than the ones from OLV and FIS diets. The difference in development observed on the 8-9hpf period was not sustained in later observation periods. These results suggest that lipids can act as modulators of embryo developmental processes.

Keywords: Embryos. Steroidogenesis. Lipids. Reproduction. Fish.

## RESUMO

O papel dos lipídeos nos mais diversos aspectos da reprodução tem sido investigado em diferentes espécies, no entanto, ainda existe pouca informação sobre como estes nutrientes podem influenciar a reprodução do zebrafish. Para estudar alguns parâmetros relacionados ao sucesso reprodutivo como composição gonadal, nível de estradiol e desenvolvimento embrionário, conduzimos um ensaio alimentar de 5 meses utilizando óleo de oliva (OLV), óleo de linhaça (LIN), óleo de peixe (FIS) e óleo de milho (CRN) para compor 4 dietas experimentais isoproteicas e isoenergéticas. O nível de EPA, ARA e especialmente de DHA encontrado nos ovários foram maiores que os encontrados na carcaça para todos os tratamentos, mostrando uma possível deposição preferencial destes HUFAs nos ovários durante o período reprodutivo. O grupo alimentado com FIS teve níveis mais elevados de estradiol ( $367.51 \pm 31.37$  pg/mg) que os demais grupos. Os embriões com 8-9 horas pós-fertilização (hpf) provenientes dos peixes que receberam a dieta CRN se mostraram mais desenvolvidos do que os oriundos do tratamento OLV e FIS. A diferença no desenvolvimento observada no período de 8-9 horas não se manteve nos demais períodos de observação. Nossos resultados sugerem que os lipídeos podem atuar como moduladores do processo de desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: Embriões. Esteroidogênes. Lipídeos. Reprodução. Peixes.

## 1 INTRODUCTION

The importance of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3), eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and arachidonic acid (ARA, 20:4n-6), collectively known as highly unsaturated fatty acids (HUFAs), in broodstock nutrition has received considerable attention during the past decade (Izquierdo et al 2001; Bell and Sargent, 2003; Furuita et al., 2003). Comparisons between the reproductive performance of wild and captive fish had highlighted the inadequate supply of HUFA to farmed animals as one of the major factors responsible for the decline in reproductive outcome (Salze et al., 2005; Brooks et al., 2007; Seaborn et al., 2009; Palacios et al., 2007). In fact, there is consistent evidence suggesting the regulation of teleost reproduction by dietary fatty acids but the actual mechanisms and pathways involved are still largely unknown. Therefore, understanding the actual role of ARA, EPA and DHA in various aspects of reproduction, such as oocyte maturation, ovulation, spawning, embryonic development, hatching success and larval quality became a priority (Salze et al., 2005; Sorbera et al., 2001; Bell and Sargent, 2003; Patino et al., 2003; Johnson 2009; Wilson, 2009).

HUFAs obtained from the diet or endogenously synthesised from C18 precursors are readily incorporated in cell membranes and lipid depots. Through the action of different signals, these fatty acids can be mobilised, mainly via phospholipase A<sub>2</sub>, and give rise to a series of biologically-active products collectively known as eicosanoids. The eicosanoids originated from EPA generally have a lower biological potency when compared to those formed by ARA, and this difference is responsible for the modulatory effect of the EPA/ARA ratio on eicosanoid function (Tocher, 2003; Tocher et al., 2008). Eicosanoids have distinct roles in the reproductive process. Prostaglandins



produced in ovaries mediate the resumption of meiosis and the maturation of the oocyte and affect the steroidogenesis (Sorbera et al., 2001; Paul et al., 2010).

Through the steroidogenic pathway, cholesterol is converted to oestradiol in ovaries via a process that seems to be regulated HUFAs, especially by ARA (Stocco et al., 2005). In goldfish, ARA can stimulate ovarian steroid production by conversion to prostaglandin, and this process can be blocked by cyclooxygenase inhibitors (Van Der Kraak and Chang 1990; Wade and Van Der Kraak 1993; Mercure and Van Der Kraak 1996; Lister and Van Der Kraak, 2008). Other PUFAs including EPA, DHA, have being shown to affect steroid production. In the ovarian follicles of goldfish and rainbow trout, EPA and DHA inhibited GTH-stimulated testosterone production in a dose-related fashion (Mercure and Van Der Kraak 1995, 1996). Collectively, these studies demonstrate that the endocrine control of reproduction in teleosts is affected in different way by fatty acids, through multiple mechanisms.

The zebrafish has emerged as the model organism of choice in biomedical research and has been widely cultivated in research facilities around the world, yet very little information on its nutrient requirements is available (Lawrence, 2007). The need for a constant supply of good quality embryos for the research has drawn attention to the importance of broodstock nutrition. There is sparse data on different nutrients, but to achieve an optimum nourishment of the breed there is still much to be accomplished (Lawrence, 2007). The capacity of elongate and desaturated C18 fatty acids to obtain the physiological essential n-3 and n-6 HUFA has already being demonstrated in zebrafish showing that, as for most freshwater fish, the supplementation of linolenic (C18:3n-3) and linoleic (C18:2n-6) acids would be sufficient for normal development. However, it has been suggested that the high demand for HUFAs during reproduction can overcome the endogenous synthesis capacity (Glencross, 2009).

In order to investigate how different fatty acid profiles can interfere with reproduction, a feeding trial was conducted and different aspects relating to reproductive success, such as gonadal composition, oestradiol level, embryonic development and hatching rate, were evaluated.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Animal housing and experimental diets

uring the experiment the fish were kept in 28 glass aquariums with 10L capacity assembled in a closed recirculation system with a controlled temperature (29°C) and a 14:10 LD regime. Each aquarium was populated with ten 4 month old female zebrafish (one fish per litter) with an initial standard length of  $20 \pm 4$ mm, purchased from regional pet shop suppliers. Water quality parameters, such as toxic ammonia ( $0.00 \pm 0.01$ ppm), nitrite ( $0.00 \pm 0.02$ ppm), pH ( $7.2 \pm 0.1$ ) and dissolved oxygen ( $5.1 \pm 0.2$ mg/l) were monitored on a weekly basis to ensure that levels were kept within the recommended range for the species (Lawrence, 2007).

Olive (OLV), linseed (LIN), fish (FIS) and corn (CRN) oil were used to compose four isonitrogenous and isoenergetic experimental diets, which, except for the oil sources used in the formulation, shared the same composition (table 1). The nutritional composition of the diets was adjusted to resemble the levels of the commercial diet used in the pre-experimental period (TetraMin® Tetra Werke, Germany) and the one proposed by Tocher et al (2002). Each diet was assigned to a group of seven aquariums that were randomly chosen. The fish were fed twice a day for 5 months, during the light period (08:00 and 17:00 h) until satiation. The aquariums were cleaned 40 minutes before every meal.

Table 1 Experimental diet composition

Diet Composition (%)	OLV	LIN	FIS	CRN
Salmon meal	66.175	66.175	66.175	66.175
Gelatin	6	6	6	6
Oil source	9	9	9	9
Corn starch	11	11	11	11
Bicalcium phosphate	1.5	1.5	1.5	1.5
Vitamin and mineral premix	0.3	0.3	0.3	0.3
BHT	0.025	0.025	0.025	0.025
cellulose	6	6	6	6
Crude Protein*	44.96	44.96	44.96	44.96
Crude energy*	4315.75	4315.75	4315.75	4315.75
Selected fatty acids in total lipids (%)				
Palmitic acid (C16:0)	16.78	12.62	20.12	16.33
Stearic acid (C18:0)	3.91	4.84	3.84	3.46
Oleic acid (18:1n-9)	52.55	19.41	13.72	29.62
Linoleic acid (18:2n-6)	7.25	11.79	4.55	30.78
Linolenic acid (18:3n-3)	0.93	31.95	0.89	1.07
Arachidonic acid (20:4n-6)	0.39	0.51	0.96	0.50
EPA (20:5n-3)	3.14	3.24	12.64	3.04
DHA (22:6n-3)	3.31	3.52	8.55	3.73

Before starting the experimental diets an adaptation period of three weeks was established to allow the animals to adapt to the experimental conditions and routine. During this period the commercial diet was used.

Breeding was carried out once a week for the last two months of the feeding trial, in separated spawning tanks. Male *zebrafish* were kept in separate tanks and fed commercial diets twice a day and selected randomly for spawning. For each breeding event a fresh group of males was used.

## 2.2 Sample collection

At the end of the feeding trial, five fishes of each of the 28 tanks were randomly collected and sacrificed with a lethal dose of 2-phenoxyethanol (1:500 v/v, Fluka, Sigma-Aldrich, Brazil). 2 minutes after opercular movements completely ceased, fish were removed from the 2-phenoxyethanol solution and rinsed in distilled water to remove residual anaesthetic from the body, and were then dried on absorbent paper. Four fish were designated to fatty acid analysis and one to oestradiol quantification. Lipids were extracted from the gonads and carcass and body oestradiol was assayed in the whole fish. All samples were immediately stored at -80°C until the analyses were performed.

## 2.3 Lipid extraction and fatty acid analysis

The fatty acid methyl esters (FAME) were obtained using a modification of the Folch, Lees & Stanley method (1957). The lipids were extracted from 0.1g of lyophilised samples, using methanol and chloroform. After extraction, the chloroform fraction of the mixture, which contained the extracted lipids, was separated, filtered and transferred to a new tube, where the chloroform was evaporated under nitrogen flux in a 30°C water bath. The lipid extract was saponified with NaOH (0.5M in methanol) and the fatty acids were esterified with an esterifying complex (stock solution: 10g ammonium chlorate, 15ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and 300ml methanol). FAMES were resuspended in hexane prior to injection.

The FAME profile in diets and zebrafish samples were determined using a GC2010 gas chromatograph (Shimadzu), equipped with a flame ionisation detector (FID) and an SP<sup>m</sup>-2560 fused silica capillary column (100m x 0.25mm, 0.20µm film; Supleco, USA). The initial column temperature, which was

sustained for 5 minutes, was 140°C. The temperature was then raised to 240°C in a 4°C min<sup>-1</sup> program. The carrier gas was helium (20cm/sec). The FID and injector temperatures were adjusted to 260°C. The fatty acid peaks were integrated using GC solution Chromatography Software (ver. 4.02) and identification was carried out with reference to known standards (37 Component FAME Mix, Supelco, Canada).

#### **2.4 Oestradiol extraction and analysis**

Each fish was weighed and lyophilised before extraction. Samples were ground in 1ml of phosphate buffered saline (PBS 1x) and transferred to clean screw top glass tubes. All of the material used to macerate samples was rinsed with an additional 2ml of PBS 1x. Samples were ultra-sonicated for 10 minutes at 30°C and then 5ml of diethyl ether was added, before the samples were vortexed for 40 seconds.

To separate the ether phase from the polar fraction, samples were centrifuged for 30 minutes at 14,000g and then frozen at -20°C for 40 minutes, after which the unfrozen portion was transferred to a clean glass tube. The ether was evaporated under a nitrogen stream at 30°C.

Samples were resuspended in 1ml of PBS 1x with 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) and analysed according to the Cayman oestradiol EIA kit manual recommendations. All samples were assayed in triplicate.

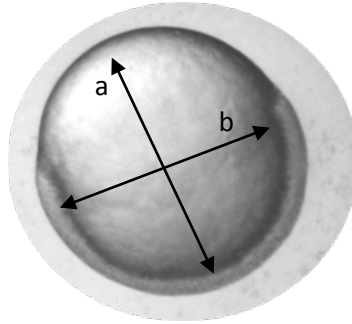
#### **2.5 Ovary total protein quantification**

For each aquarium, 2 females (14 animals per treatment) were used to analyse the total ovary protein level. The quantification was done using the

Bradford (1976) technique and the absorbance was read at 590nm. The curve was adjusted using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

## **2.6 Embryonic developmental evaluation**

From each reproduction, fertilised eggs were collected and transferred to 200ml experimental incubators filled with E3 medium (5mM NaCl , 0.17mM KCl , 0.33mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% methylene blue (Sigma)), aerated with air stones. The temperature was adjusted to  $26 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  for all units and the media was replaced daily. The evaluation was done under a stereo microscope at 8 hours post-fertilisation (hpf), 25hpf, 35hpf and 50hpf. The evaluation times were chosen to coincide with representative morphological changes of the embryo and based on practical reasons due to laboratory schedule. For each evaluation, 30 embryos were collected from each incubator and the predominant developmental stage was recorded. The determination of the developmental stages was done as according to the descriptions by Kimmel and co-workers (1995). A scoring system was created to characterise the developmental stage. The values attributed to each stage were obtained considering a minimum score of 0 for a just-fertilised egg and a maximum score of 10 for ecloding larva. All intermediate values were attributed based on the chronological position which they occupied in development, as shown in table 2. Digital images were taken during the evaluations to perform measurements on the vitelinic sac (longest and shortest diameter) of the embryos, as exemplified in figure 1.



Legend: “a” corresponds to largest diameter and “b” to shortest diameter.

Figure 1 Representation of the measurements taken from embryos



Table 2 Developmental score system

Stage	score
DOME	0.6
50% EPIBOLY	0.7
GERM-RING	0.8
60% EPIBOLY	0.8
70% EPIBOLY	1.0
80% EPIBOLY	1.1
90% EPIBOLY	1.3
95% EPIBOLY	1.3
BUD	1.4
3 SOMITE	1.5
6 SOMITE	1.6
14 SOMITE	2.2
18 SOMITE	2.6
21 SOMITE	2.6
26 SOMITE	3.1
PRIM 5	3.3
PRIM 6	3.3
PRIM 12	4.2
PRIM 20	4.9
PRIM 25	5.0
PRIM 26	5.1
HIGH PEC	5.8
LONG PEC STAGE (48H)	6.7
PEC FIN STAGE (60h)	8.3

## 2.7 Statistical analysis

A completely randomised design was adopted during the experiment where four different diets were tested in seven replicates totalling 28 plots. Differences between the means for each fatty acid level and oestradiol were

assessed by one way analysis of variance (ANOVA). When overall differences existed, specific differences were assessed using Tukey's HSD *post hoc* test. The significance of the difference was determined at  $p < 0.5$  for fatty acids data and  $p < 0.7$  for oestradiol levels. Values were expressed as means  $\pm$  SEM. When necessary, data were transformed in order to comply with normality and homogeneity of variance, which were tested by the Kolmogorov–Smirnov and Bartlett methods, respectively. The expression of the EIA results was performed after linearisation of the sigmoid standard curve using the logit transformation ( $\text{logit}(B/B_0) = \ln(B/B_0/(1-B/B_0))$ , where B represents the binding of each point, and B0 the maximum binding subtracted from the non-specific binding NSB). The association between variables was analysed by Pearson correlation index when pertinent. Differences in developmental scores were evaluated using the Kruskal-Wallis test on ranked scores at a significance level of  $p < 0.5$ . A Box-and-Whisker Plot was used to illustrate relevant information on the developmental score. A notch was added to each box to allow a comparison between the sample medians at a 95% confidence level. To analyse vitelinic sac measurements in embryos, the main effects of diets were studied isolated from the influence of each reproduction.

### 3 RESULTS

#### 3.1 Fatty acid analysis

The diets were able to input significant changes in carcass lipid profile. The predominant fatty acid found in each diet had increased levels in animals that were fed on that diet. The highest levels of DHA ( $5.82 \pm 1.70\%$ ) and EPA ( $5.82 \pm 1.29\%$ ) were found in fish that received the FIS diet, and the more prominent oleic ( $47.94 \pm 4.45\%$ ), linoleic ( $25.03 \pm 0.37\%$ ) and linolenic ( $17.02 \pm 3.37\%$ ) acid levels were found in the OLV, CRN and LIN groups respectively. The presence of high levels of linolenic acid on the LIN group diet was not sufficient to cause a significant rise in EPA and DHA levels on the carcass and the ARA level was no higher in the CRN diet in spite of the presence of elevated levels of its precursor in the diet. Fish fed on the FIS diet showed more elevated levels of palmitic acid ( $24.70 \pm 1.81\%$ ).

Table 3 Selected fatty acids in the zebrafish carcass lipid profile

Carcass fatty acid composition (%)	Experimental diets				<i>P</i> value
	OLV	LIN	FIS	CRN	
C16:0	$19.53 \pm 0.99$ b	$18.51 \pm 2.44$ b	$24.70 \pm 1.81$ a	$19.78 \pm 1.63$ b	0.000065
C18:0	$4.02 \pm 0.85$ a	$4.23 \pm 0.34$ a	$3.93 \pm 0.32$ a	$3.74 \pm 0.26$ a	0.390334
18:1n-9	$47.94 \pm 4.45$ a	$27.32 \pm 2.07$ c	$23.98 \pm 2.63$ c	$32.78 \pm 1.31$ b	0.000000
18:2n-6	$8.35 \pm 1.58$ c	$12.92 \pm 0.56$ b	$8.17 \pm 0.62$ c	$25.03 \pm 0.37$ a	0.000000
18:3n-3	$0.81 \pm 0.08$ b	$17.02 \pm 3.37$ a	$1.11 \pm 0.05$ b	$0.96 \pm 0.14$ b	0.000000
20:4n-6	$0.85 \pm 0.40$ a	$0.76 \pm 0.18$ a	$1.12 \pm 0.18$ a	$0.91 \pm 0.34$ a	0.423816
20:5n-3	$1.24 \pm 0.26$ b	$1.61 \pm 0.43$ b	$5.82 \pm 1.29$ a	$1.06 \pm 0.27$ b	0.000000
22:6n-3	$3.42 \pm 1.32$ b	$3.39 \pm 0.79$ b	$5.82 \pm 1.70$ a	$3.21 \pm 1.15$ b	0.006165

Means followed by different letters differs significantly by Tukey test ( $p < 0.05$ ).

Ovary composition was also affected by the diets. The FIS diet produced more elevated EPA levels ( $7.96 \pm 2.31\%$ ) than the other groups. The DHA levels did not differ significantly between treatments. As in carcass composition, the highest oleic ( $35.65 \pm 7.97$ ), linoleic ( $17.56 \pm 3.35$ ) and linolenic ( $10.06 \pm 1.61\%$ ) acid levels were found in the OLV, CRN and LIN groups, respectively. In contrast to what occurred in the carcass, the ARA levels found in ovaries of the CRN group were significantly more elevated ( $1.48 \pm 0.44\%$ ) than those found in fish that received the OLV and LIN diets. The levels of EPA, ARA and especially DHA found in ovaries were higher than in the carcass for all diets, showing a possible preferential accumulation of these HUFAs in ovary.

Table 4 Selected fatty acids in zebrafish ovary lipid profiles

Ovaries fatty acid composition (%)	Experimental diets				<i>P</i> value
	OLV	LIN	FIS	CRN	
C16:0	$26.65 \pm 3.04$ a	$27.42 \pm 1.56$ a	$28.60 \pm 2.71$ a	$25.10 \pm 2.19$ a	0.103167
C18:0	$5.21 \pm 1.10$ b	$7.32 \pm 0.83$ a	$5.03 \pm 1.00$ b	$5.26 \pm 1.00$ b	0.000642
18:1n-9	$35.65 \pm 7.97$ a	$21.56 \pm 1.89$ b	$19.71 \pm 5.40$ b	$25.31 \pm 2.49$ b	0.000029
18:2n-6	$5.87 \pm 1.91$ b	$6.90 \pm 2.48$ b	$4.80 \pm 1.10$ b	$17.56 \pm 3.35$ a	0.000000
18:3n-3	$1.83 \pm 3.28$ b	$10.06 \pm 1.61$ a	$0.63 \pm 0.23$ b	$0.46 \pm 0.19$ b	0.000000
20:4n-6	$0.85 \pm 0.21$ b	$0.95 \pm 0.20$ b	$1.18 \pm 0.40$ ab	$1.48 \pm 0.44$ a	0.015011
20:5n-3	$2.29 \pm 0.54$ b	$3.91 \pm 0.88$ b	$7.96 \pm 2.31$ a	$2.32 \pm 0.45$ b	0.000000
22:6n-3	$8.62 \pm 2.36$ a	$9.48 \pm 2.21$ a	$11.14 \pm 3.65$ a	$9.87 \pm 3.55$ a	0.475208

Means followed by different letters differs significantly by Tukey test ( $p < 0.05$ ).

### 3.2 Oestradiol analysis

The FIS fed group had the higher oestradiol level ( $367.51 \pm 31.37$  pg/mg) and the other groups showed similar concentrations (Figure 2). A positive correlation between the ovary EPA levels and the whole body oestradiol level was found ( $p = 0.002$ ) (see Table 5).

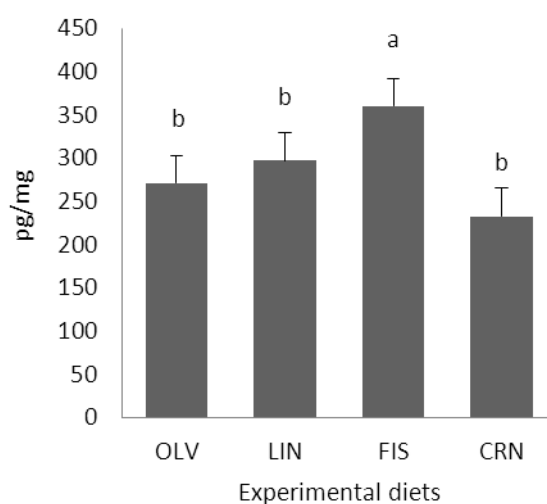


Figure 2 Female zebrafish whole body oestradiol concentration. Columns with different superscript letters are significantly different as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test (P-Value = 0.0697 significant at alpha = 0.07).

Table 5 Pearson correlation coefficient for oestradiol and HUFAs

	ARA	EPA	DHA
Pearson Correlation r for oestradiol level	-0.116	0.606**	-0.314
Sig. (2-tailed)	0.626	0.005	0.177

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

### 3.3 Embryo development

Embryo development between 8 and 9hpf was differently affected by brood fish diets (Figure 3). Embryos from fish that received the CRN diet were more developed than the ones from OLV and FIS diets, and embryos from the LIN diet had scores similar to the other groups, although the variability in the scores was greater.

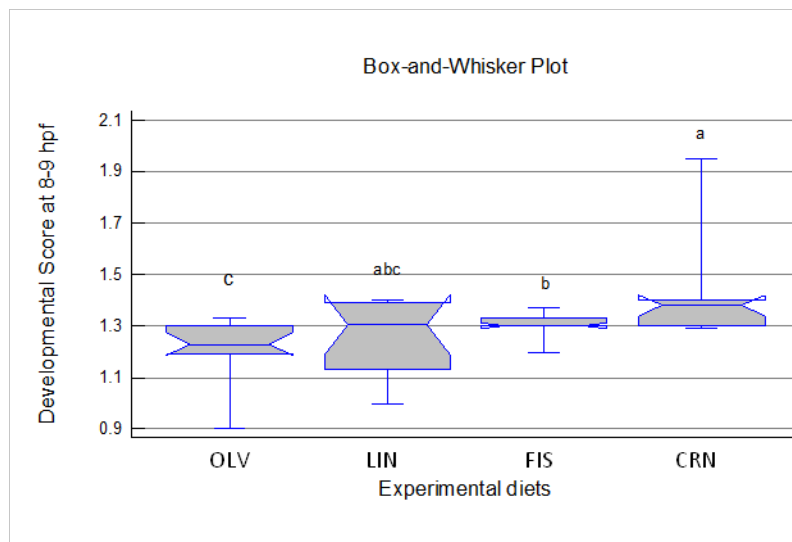
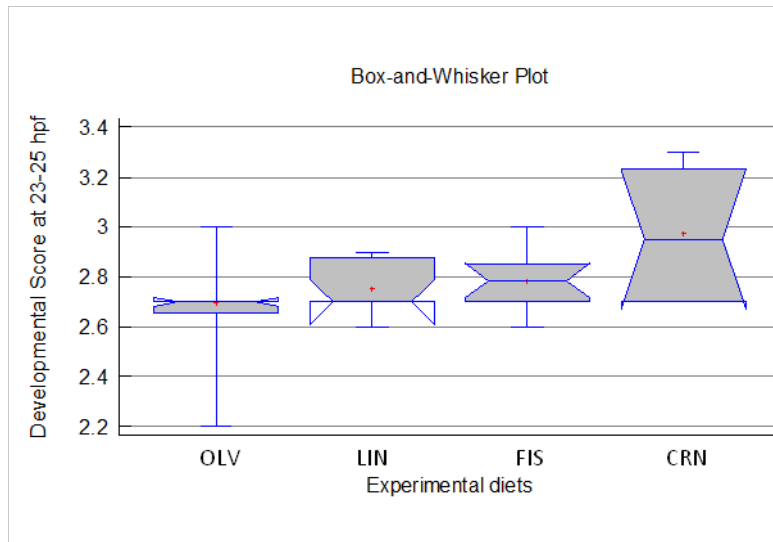


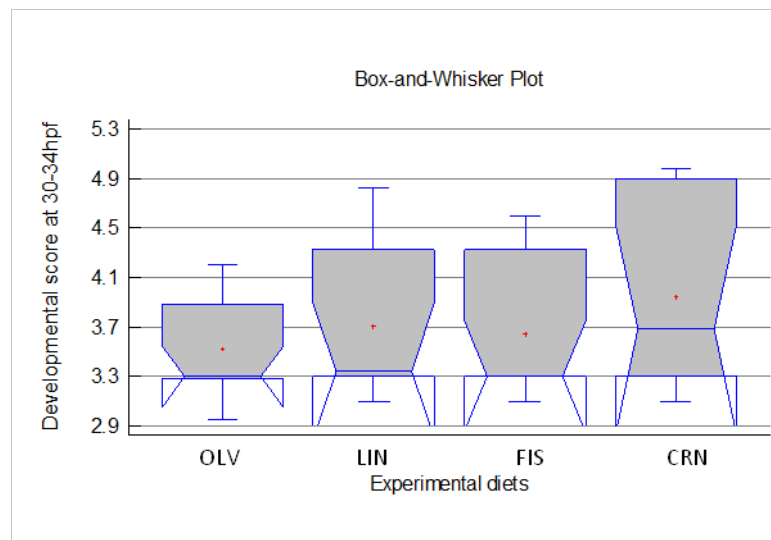
Figure 3 Box-and-whisker plot of developmental score at 8-9hpf. Columns with different superscript letters are significantly different (P-Value = 0.00697456).

The difference in development observed in the 8-9hpf period was not sustained in the other observation periods, although the means were numerically higher (but not statistically significant) for the CRN group scores (Figures 4-6).



P-Value = 0.148718.

Figure 4 Box-and-whisker plot of developmental score at 23-25hpf.



P-Value = 0.76113.

Figure 5 Box-and-whisker plot of developmental score at 30-34hpf.

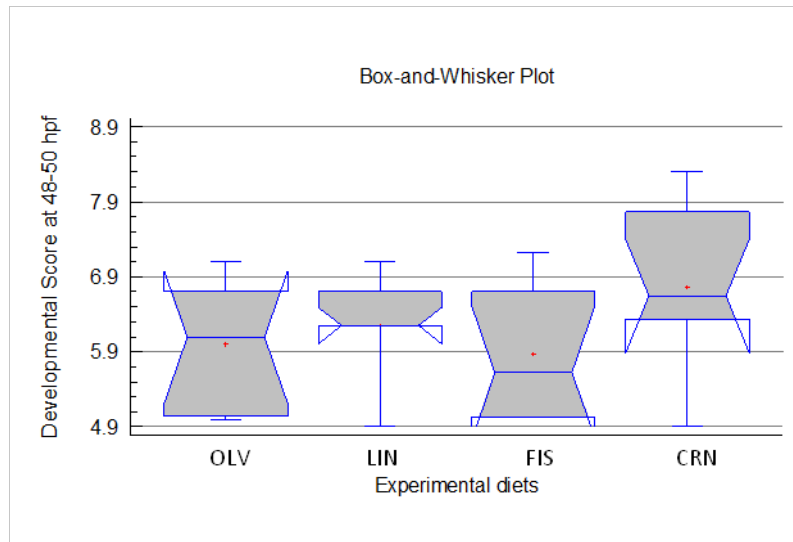


Figure 6 Box-and-whisker plot of developmental score at 48-50hpf.

Eclosion rates were affected differently by the experimental diets (Figure 7). The fish oil inclusion resulted in a higher percentage of larvae ( $66.77 \pm 5.43\%$ ) at 72hpf when compared to the OLV group ( $45.95 \pm 5.18\%$ ). The results observed for LIN ( $56.53 \pm 6.08\%$ ) and CRN ( $52.46 \pm 5.43\%$ ) were similar to the other treatments.



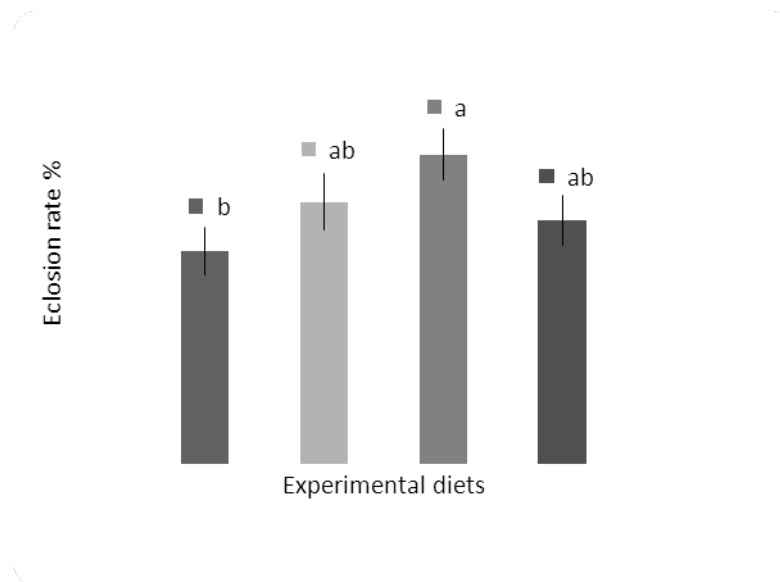


Figure 7 Eclosion rate at 72hpf. Columns with different superscript letters are significantly different as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test (P value = 0.0623; significant at alpha = 0.07).

### 3.4 Embryo vitelinic sac measurements

Differences in embryo vitelinic sac measurements among treatments were observed only at the 8-9hpf period (Figure 8), showing that the development was more sensitive to the lipid profile at this period. In general, the treatments where HUFAs or their precursors were found in abundance had larger yolk sacs when compared with the OLV group. The mean values taken for the largest and shortest diameters were progressively reduced from 8-9hpf to 48-50hpf indicating a yolk consumption throughout embryo development.

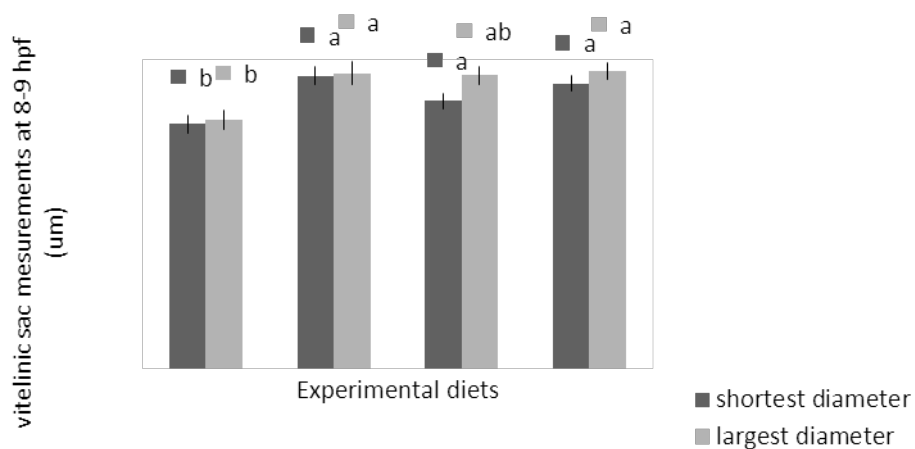


Figure 8 The largest and shortest diameters of the vitelinic sac at 8-9hpf. Columns with different superscript letters in the same measurement are significantly different as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test (largest diameter p value: 0.0105; shortest diameter p value: 0.0004).

### 3.5 Protein content of the ovaries

There was no clear effect of dietary lipids on the ovary protein content of zebrafish. The highest mean was recorded for the CRN group ( $551.56 \pm 21.6\text{mg/g}$ ) but no statistical evidence supporting differences for this parameter were found. There were also no significant correlations between carcass and ovary fatty acids and ovary protein levels.

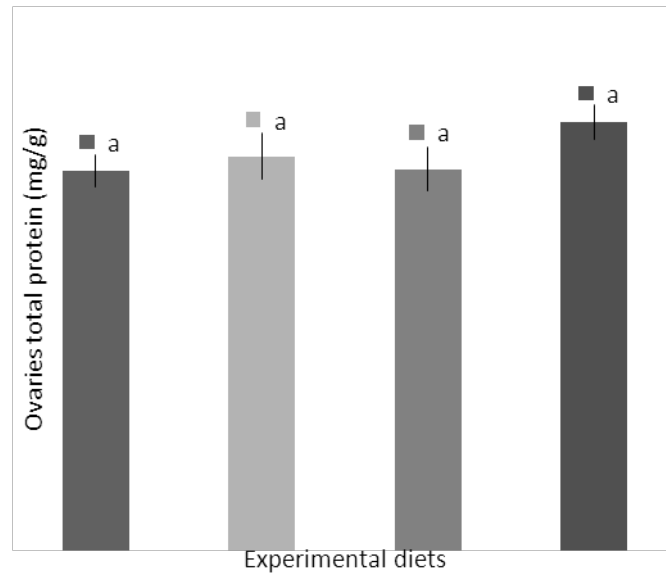


Figure 9 Zebrafish ovary total protein levels (dry matter basis). Columns with same superscript letters are not significantly different as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test (P value: 0.304).

## **4 DISCUSSION**

### **4.1 Carcass lipid profile**

The fatty acids profile obtained in the carcass, in general, reflected the profile present in the diet. The presence of linoleic acid in abundance in CRN treatments did not result in a significant elevation of its elongated product, ARA, and the levels of EPA and DHA were not changed by the higher linolenic acid concentration found in the LIN group as expected, since zebrafish have active elongase and desaturase to complete the transformation. Agba and coworkers (2002) described an elongase in zebrafish that was able to lengthen the chain of a range of C18, C20, and C22 polyunsaturated fatty acids. Therefore, zebrafish would appear to be able to perform all 6 desaturation and elongation reactions necessary for the production of DHA from 18:3n-3. It was demonstrated that zebrafish up-regulate the expression of the elongase and desaturase enzymes when HUFAs were deficient in their diet, although this up-regulation does not always imply a significant ARA, EPA and DHA deposition in the carcass (Jaya-Ram et al., 2008). This behaviour of HUFA deposition in the carcass in the presence of c18 precursors was also reported by different studies, where a limited HUFA deposition in freshwater fish carcass was observed (Tocher et al., 2002; Francis et al., 2006; Karapanagiotidis et al., 2007).

### **4.2 Lipid profile of ovaries**

The lipid profile of ovaries had relatively higher concentrations of DHA in comparison with the carcass, although the levels were not statistically different among treatments in this tissue. This is consistent with a conservative pattern of deposition where the levels are kept relatively constant, even when

HUFAs are deficient in the diet. This has also been observed in Atlantic salmon (Bell et al. 2001) and in European seabass (Mourente et al. 2005), among other species. DHA is an important component of phosphoglycerides, particularly phosphatidyl ethanolamine and phosphatidyl choline, in gonads, larvae, and juveniles, and is necessary for reproduction and growth (Izquierdo 2005; Tocher 2003; Tocher et al 2008).

The ARA concentration was more pronounced in the ovaries of fish treated with CRN diets showing that, at list for this organ, linoleic acid contributed to the build-up of ARA levels. The EPA levels were also distinctly influenced by the dietary lipid source showing, as observed for carcass composition, a higher concentration for the FIS group. ARA is the major precursor for the formation of prostaglandin via the cyclooxygenase pathway and has been shown to mediate steroidogenesis, oocyte maturation and ovulation (Mercure and Van Der Kraak, 1996; Sorbera et al., 2001; Pati and Habibi, 2002; Patino et al., 2003).

During spawning season, a period of reduced feed intake is commonly observed and muscle seems to be an important HUFA resource during fish reproduction (Almansa et al., 2001; Rodriguez et al., 2004; Jerez et al., 2006; Perez et al., 2007). In addition, the preferred accumulation of HUFA in some tissue has been seen in preparation for spawning in marine and freshwater species (Jeong et al., 2002; Pickova et al., 2007; Yanes-Roca et al., 2009).

Distinct studies compared HUFA profiles in the gonadal tissues of wild and captive broodstock and its effect on reproduction, and a potential detrimental effect of inadequate dietary levels of ARA and DHA on reproduction was pointed out (Salze et al., 2005; Seaborn et al., 2009). The higher concentration of DHA in eggs as compared to muscle, irrespective of the dietary treatment is indicative of the selective accumulation of DHA in eggs (Furuita et al., 2007; Garrido et al., 2007; Huynh et al., 2007)

### 4.3 Whole body oestradiol level

Female zebrafish that received the FIS diet had more elevated body levels of oestradiol, indicating that the oestradiol level was affected by the dietary lipid profile. A positive correlation was found between the EPA level and body oestradiol. The effects of fatty acids on ovary steroidogenesis were described in mammals and fish species with variable results. Kassem et al (2011) studied the effect of n-3 and n-6 fatty acid supplementation on foetal, gestation and parturition periods in pregnant Sprague Dawley rats and observed that the group with the highest ratio of n6:n3 fatty acids with high ARA showed significantly higher plasma oestradiol. A lower level of oestradiol in fish receiving a vegetable oil diet (cotton seed oil, soy bean oil and linseed oil) in comparison with fish fed on fish oil-based diet was also reported by Wassef and co-workers (2011) for the gilthead seabream, *Sparus aurata*.

According to Mercure and Van Der Kaark (1995), the inclusion of EPA and DHA in cell culture media caused an inhibitory effect on gonadotropin-stimulated testosterone production in follicles from goldfish and rainbow trout in a dose-dependent way, while ARA stimulated testosterone production. The steroidogenic inhibitory effects were also observed with c18 PUFAs, such as linoleic and linolenic acids, with results similar to corresponding HUFAs in goldfish.

In the present work there was no statistical evidence of a correlation between ARA and oestradiol levels ( $p=0.626$ ) although a positive relationship with EPA for this parameter was found ( $p=0.005$ ). EPA has been also implicated in steroidogenic activity, as previously observed by Hughes and co-workers (2011) in an *in vitro* study designed to investigate the effects of fatty acids on ovine follicular cell steroidogenesis. The authors found that E2 production by ovine follicular cells were not affected by the dietary source of PUFA. In

contrast, progesterone concentrations in the media were higher in the presence of n-3 PUFA than n-6 PUFA. It was also found that n-3 PUFA also increased STAR transcript expression relative to n-6 PUFA.

The role of oestradiol as one of the most active regulators of vitellogenesis has been well established. In addition to stimulating vitellogenesis, E2 can stimulate the release of FSH (important for gametogenesis and steroidogenesis) through positive-feedback on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, and high concentrations of E2 are necessary for the induction of the pre-ovulatory LH surge, resulting in the maturation of oocytes (Kobayashi et al., 1989; Nagahama et al., 1995; Peter and Yu, 1997; Tyler et al., 1991). Therefore, it is reasonable to assume that the level of oestradiol can interfere to some degree in the reproductive outcome. The highest oestradiol concentration was found in the FIS group and the eclosion rate for this treatment was the highest among diets. However, whether the better result observed in the FIS group is directly caused by oestradiol or by other effects of fatty acids remains to be elucidated.

#### **4.4 Total protein content of ovaries**

The total protein content in zebrafish ovaries was not affected by the dietary lipid source. A more elevated protein level in ovaries could be an indirect measure of vitellogenin accumulation although this method may lack specificity for detecting any actual specific variation in vitellogenin content. Ling and co-workers (2006) studied the impact of varying dietary lipid levels in poeciliid brood fish and did not find any significant effect either on protein or lipid content in female ovaries.

#### 4.5 Developmental score

The developmental score system applied in the present work provided a useful tool for the study of dietary influence on embryo development, presenting some advantages over the simple frequency distribution of each developmental stage, such as the possibility of summarising information of several individual evaluations in one single numerical value instead of dealing with multiple different classes distributed asymmetrically among samples.

According to Kimmel (2005), the classification of embryos in different developmental stages can reveal interesting effects in reproduction studies mainly because different embryos develop at slightly different rates, even when taken from the same batch and cultivated in optimal conditions. Genetic uniformity does not eliminate this characteristic, since embryos of a clonal strain of zebrafish also develop asynchronously (Westerfield, 1995). It is reasonable to assume that variations in brood fish nutrition would produce significant variations in development, especially during the earlier phases, due to the dependence of embryos on preformed nutrients, hormones and enzymes transferred by the female during oogenesis.

The developmental score recorded at 8-9hpf revealed a positive effect of the CRN diet on embryo development, but this effect was not sustained during the latter periods of evaluation. It is probable that ARA plays a key role in early phases of tissue differentiation. The relative precocity observed for the CRN group was not followed by higher eclosion rates, which could indicate the need for both n-3 and n-6 series to accomplish a better reproductive outcome.

According to Moroig and co-workers (2009), the expression of genes encoding enzymes involved in HUFA biosynthesis, namely fatty acyl desaturase and Elovl5- and Elovl2-like elongases, which provide the ability to convert C:18 precursors into essential C:20 and C:22 HUFAs, are detected from the very



beginning of zebrafish embryonic development. However, the complete activation of the biosynthetic pathway seems to be delayed until 12hpf, when noticeable increases of *fad* and *elovl2* transcripts can be observed in parallel with high docosahexaenoic acid levels in the embryo. Spatial expression was studied by whole-mount in situ hybridisation in 24hpf embryos, showing that *fad* and *elovl2* are highly expressed in the head area where neuronal tissues are developing. The same group (Moroig et al., 2011) also investigated the spatial temporal expression of these enzymes in cobia, a marine fish. Surprisingly, the results were similar to those found in zebrafish. Cobia presented a functional HUFA synthesis pathway during embryo development from 12hpf onwards.

Information on how fish embryonic development responds to broodstock lipid nutrition is very scant and it was not possible to compare the current results with the work of other groups. However, data from mammalian studies suggest that development is differently affected by diet.

Despite normal fertilisation and development *in vitro* following IVF, the exposure of oocytes to an environment high in n-3 PUFA during *in vivo* fertilisation decreased the developmental ability to the blastocyst stage. This study suggests that high maternal dietary n-3 PUFA exposure peri-conception reduces normal embryo development in the mouse and is associated with perturbed mitochondrial metabolism.

In the present work, the development was affected by diet, more specifically by the CRN diet, only in the 8-9hpf evaluation period, which could be related with the lack of a functional pathway to synthesise HUFAs. The presence of preformed ARA was probably higher in the embryos of the CRN group, but this is highly speculative since the composition of the embryos and the expression of the enzyme transcripts were not determined. However, the composition of the ovaries did show an increased presence of ARA for the CRN group.

#### 4.6 Eclosion rate

The highest eclosion rates were observed in the FIS treated group, with no significant variations among the other groups. Furuita and co-workers (2007) investigated the importance of the ARA/EPA ratio on different reproductive parameters of Japanese eel and found that the eclosion rate was higher when broodstock was supplemented with fish oil in comparison with groups that received corn oil alone or combinations with fish oil. N-3 HUFA also positively affected the eclosion rate in white bass and *Catla catla* according to Lane and Kohler (2006) and Nandi et al. (2007), respectively.

A significant correlation was pointed out by Yanes-Roca and co-workers between the DHA concentrations of the common snook (*Centropomus undecimalis*) eggs and fertilisation percentage, hatching percentage and larval survival, where a higher DHA snook egg concentration led to the higher fertilisation percentage, hatching percentage and larval survival. These results were also similar for yellow-fin sea bream, *Acanthopagrus latus*, according to Zakeri and colleagues (2011).

The effect of fatty acids on viability parameters varies greatly among different fish. In tilapia, for instance, a high n-3/n-6 ratio is found to be detrimental to reproduction and a diet rich in monoenes and saturated fatty acids is responsible for higher eclosion rates (Ng and Wang, 2011).

According to Pickova and co-workers (2007) the freshwater char (*Salvelinus alpinus*) from wild and farmed differs significantly in reproductive efficiency, a fact that has been linked to the differences in the fatty acid profiles of the body and eggs. The ratio n-3/n-6 of total phospholipids of eggs was much lower in the wild fish, 3.5 versus 13.5, and the hatching rate of eggs from natural environment was much higher (20–70% vs. >80%). These results indicate the need for n-6 supplementation for the species in order to achieve better

reproductive results. The amount of HUFA supplementation also has to be considered, since an excess of an individual acid could result in an impaired reproductive performance. The Chilean flounder *Paralichthys adspersus* broodstock fed three formulated diets with different n-3 HUFAs (2.1%, 3.1% or 4.1%) showed a significantly higher percentage of buoyant eggs, fertilisation, normal cell cleavages, hatching rate and normal larvae for the group treated with an intermediate n-3 HUFA level compared with the other two diets (Wilson, 2009).

#### **4.7 Embryo vitelinic sac measurements**

The embryo vitelinic sac measurements were also differently affected by dietary treatments. The low level of HUFA and its precursors in the diet of the females from the OLV group probably adversely affected nutrient accumulation in the yolk sac from embryos, but the differences were only seen in the 8-9hpf period. The fact that there was no difference in the latter periods of evaluation may indicate differences in yolk consumption rates or an increased variability in this parameter for the other phases. This study used measurements of the size of the yolk sac to control for non-genetic parental (maternal) effects on embryonic development.

## 5 CONCLUSIONS

The fatty acid profile of ovaries and carcasses were both affected by dietary lipid composition. The presence of linoleic and linolenic acids in vegetable oil-based diets was not sufficient to promote a significant rise in ARA, EPA and DHA in the carcass, although there was a small accumulation of ARA in ovaries of the group treated with corn oil. This can be an indicative of a preferential accumulation of this fatty acid in gonadal tissue. Despite the confirmed ability to elongate and desaturate C18 PUFA to produce longer chain HUFAs, there was no significant deposition of the end products ARA, EPA and DHA in the carcass, suggesting that the supplementation of these acids are required for zebrafish broodstock during reproduction. The effect of diets on oestradiol concentration suggests a regulatory role for EPA, although the mechanisms involved remain to be elucidated. The eclosion rate was higher in the group that received fish oil and the development at 8-9hpf was relatively faster in embryos from CRN treated group, suggesting the need for both n-3 and n-6 for the optimal reproductive performance in zebrafish. The differences in early development reported in the present work suggest that lipids can act as modulators of developmental processes. As far as we know, there have been no previous reports regarding the influence of dietary fatty acids in broodstock nutrition on the dynamics of embryo development, so the mechanism for this effect still needs to be investigated.

## REFERENCES

- Agaba M, Tocher DR, Dickson CA, Dick JR & Teale AJ** 2004 Zebrafish cDNA encoding multifunctional fatty acid elongase involved in production of Eicosapentaenoic (20:5n-3) and Docosahexaenoic (22:6n-3) acids. *Marine Biotechnology* **6** 251-261.
- Almansa E, Martían MV, Cejas JR, Badí P, Jerez S & Lorenzo A** 2001 Lipid and fatty acid composition of female gilthead seabream during their reproductive cycle: effects of a diet lacking n-3 HUFA. *Journal of Fish Biology* **59** 267-286.
- Bell JG, McEvoy J, Tocher DR, McGhee F, Campbell PJ & Sargent JR** 2001 Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *The Journal of Nutrition* **131** 1535-1543.
- Bell JG & Sargent JR** 2003 Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* **218** 491-499.
- Bradford MM** 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72** 248-254.
- Brooks S, Tyler CR & Sumpter JP** 1997 Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **7** 387-416.
- Folch ML & Sloane-Stanley GH** 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* **226** 497-509.
- Francis DS, Turchini GM, Jones PL & De Silva SS** 2006 Effects of dietary oil source on growth and fillet fatty acid composition of Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. *Aquaculture* **253** 547-556.

**Furuita H, Hori K, Suzuki T, Sugita T & Yamamoto T** 2007 Effect of n-3 and n-6 fatty acids in broodstock diet on reproduction and fatty acid composition of broodstock and eggs in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture* **267** 55-61.

**Furuita H, Yamamoto T, Shima T, Suzuki N & Takeuchi T** 2003 Effect of arachidonic acid levels in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* **220** 725-735.

**Garrido S, Rosa R, Ben-Hamadou R, Cunha ME, Chicharo MA & Van Der Lingen CD** 2007 Effect of maternal fat reserves on the fatty acid composition of sardine (*Sardina pilchardus*) oocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology* **148** 398-409.

**Glencross, B. D.** 2009 Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*, 1 71-124.

**Hughes J, Kwong WY, Li D, Salter AM, Lea RG & Sinclair KD** 2011 Effects of omega-3 and -6 polyunsaturated fatty acids on ovine follicular cell steroidogenesis, embryo development and molecular markers of fatty acid metabolism. *Reproduction* **141** 105-118.

**Huynh MD, Kitts DD, Hu C, Trites AW** 2007 Comparison of fatty acid profiles of spawning and non-spawning Pacific herring, *Clupea harengus pallasi*. *Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology* **146** 504-511.

**Izquierdo MS** 2005 Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. In *Mediterranean fish nutrition*, pp 91-102. Eds D Montero, B Basurco, I Nengas, M Alexis and MS Izquierdo. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ. Cahiers Options Méditerranéennes, vol. 63. Zaragoza, Spain: CIHEAM; 2005. 158p

**Izquierdo MS, Fernández-Palacios H & Tacon AGJ** 2001 Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* **197** 25-42.

**Jaya-Ram A, Kuah MK, Lim PS, Kolkovski S & Shu-Chien AC** 2008 Influence of dietary HUFA levels on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs expression in female zebrafish *Danio rerio*. *Aquaculture* **277** 275-281.

**Jeong BY, Jeong WG, Moon SK & Ohshima T** 2002 Preferential accumulation of fatty acids in the testis and ovary of cultured and wild sweet smelt *Plecoglossus altivelis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology* **131** 251-259.

**Jerez S, Rodriguez C, Cejas JR, Bolanos A & Lorenzo A** 2006 Lipid dynamics and plasma level changes of 17[beta]-oestradiol and testosterone during the spawning season of gilthead seabream (*Sparus aurata*) females of different ages. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology* **143** 180-189.

**Johnson RB** 2009 Lipid deposition in oocytes of teleost fish during secondary oocyte growth. *Reviews in Fisheries Science* **17** 78-89.

**Karapanagiotidis IT, Bell M, Little D & Yakupitiyage A** 2007 Replacement of dietary fish oils by alpha-linolenic acid-rich oils lowers omega 3 content in tilapia flesh. *Lipids* **42** 547-559.

**Kassem AA, Bakar ZA, Meng GY & Mustapha NM** 2011 Effect of n-3 and n-6 fatty acid supplementation on foetal, gestation and parturition in pregnant Sprague Dawley rats. *African Journal of Biotechnology* **10** 7109-7116.

**Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B & Schilling TF** 1995 Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics* **203** 253-310.

**Kobayashi M, Aida K & Hanyu I** 1989 Induction of gonadotropin surge by steroid hormone implantation in ovariectomised and sexually regressed female goldfish. *General and Comparative Endocrinology* **73** 469-476.

**Lane RL & Kohler CC** 2006 Effects of dietary lipid and fatty acids on white bass reproductive performance, egg hatchability, and overall quality of progeny. *North American Journal of Aquaculture* **68** 141-150.

**Lawrence C** 2007 The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. *Aquaculture* **269** 1-20.

**Ling S, Hashim R, Kolkovski S & Shu-Chien AC** 2006 Effect of varying dietary lipid and protein levels on growth and reproductive performance of female swordtails *Xiphophorus helleri* (Poeciliidae). *Aquaculture Research* **37** 1267-1275.

**Lister AL & Van Der Kraak G** 2008 An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation. *General and Comparative Endocrinology* **159** 46-57.

**Mercure F & Van Der Kraak G** 1995 Inhibition of gonadotropin-stimulated ovarian steroid production by polyunsaturated fatty acids in teleost fish. *Lipids Volume* **30** 574-554.

**Mercure F & Van Der Kraak G** 1996 Mechanisms of action of free arachidonic acid on ovarian steroid production in the goldfish. *General and Comparative Endocrinology* **102** 130-140.

**Monroig Ó, Rotllant J, Sánchez E, Cerdá-Reverter JM & Tocher DR** 2009 Expression of long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) biosynthesis genes during zebrafish *Danio rerio* early embryogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids* **1791** 1093-1101.

**Monroig Ó, Webb K, Ibarra-Castro L, Holt GJ & Tocher DR** 2011 Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in marine fish: Characterisation of an Elovl4-like elongase from cobia *Rachycentron canadum* and activation of the pathway during early life stages. *Aquaculture* **312** 145-153.

**Nagahama Y, Yoshikuni M, Yamashita M, Tokumoto T & Katsu Y** 1995 Regulation of oocyte growth and maturation in fish. *Current Topics in Developmental Biology* **30** 103-145.

**Nandi S, Routray P, Gupta SD, Rath SC, Dasgupta S, Meher PK & Mukhopadhyay PK** 2007 Reproductive performance of carp, *Catla catla* (Ham.), reared on a formulated diet with PUFA supplementation. *Journal of Applied Ichthyology* **23** 684-691.



**Ng WK & Wang Y** 2011 Inclusion of crude palm oil in the broodstock diets of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, resulted in enhanced reproductive performance compared to broodfish fed diets with added fish oil or linseed oil. *Aquaculture* **314** 122-131.

**Palacios E, Racotta IS, Aparicio B, Arjona O & Martínez-Palacios CA** 2007 Lipid classes and fatty acids during embryogenesis of captive and wild silverside (*Chirostoma estor estor*) from Pátzcuaro Lake. *Fish Physiology and Biochemistry* **33** 81-91.

**Pati D & Habibi HR** 2002 Involvement of protein kinase C and arachidonic acid pathways in the gonadotropin-releasing hormone regulation of oocyte meiosis and follicular steroidogenesis in the goldfish ovary. *Biology of Reproduction* **66** 813-822.

**Patino R, Yoshizaki G, Bolamba D & Thomas P** 2003 Role of arachidonic acid and protein kinase C during maturation-inducing hormone-dependent meiotic resumption and ovulation in ovarian follicles of Atlantic croaker. *Biology of Reproduction* **68** 516-523.

**Paul S, Kundu S, Pramanick K, Bandyopadhyay A & Mukherjee D** 2010 Regulation of ovarian steroidogenesis *in vitro* by gonadotropin in common carp *Cyprinus carpio*: interaction between calcium- and adenylate cyclase-dependent pathways and involvement of ERK signalling cascade. *Journal Molecular Endocrinology* **45** 207-218.

**Perez MJ, Rodriguez C, Cejas JR, Martin MV, Jerez S & Lorenzo A** 2007 Lipid and fatty acid content in wild white seabream (*Diplodus sargus*) broodstock at different stages of the reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology* **146** 187-196.

**Peter RE & Yu KL** 1997 Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: Basic and applied aspects. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **7** 173-197.

**Pickova J, Brännäs E & Andersson T** 2007 Importance of fatty acids in broodstock diets with emphasis on Arctic char (*Salvelinus alpinus*) eggs. *Aquaculture International* **15** 305-311.

**Rodriguez C, Acosta C, Badia P, Cejas JR, Santamaria FJ & Lorenzo A** 2004 Assessment of lipid and essential fatty acids requirements of black seabream (*Spondyliosoma cantharus*) by comparison of lipid composition in muscle and liver of wild and captive adult fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology* **139** 619-629.

**Salze G, Tocher DR, Roy WJ & Robertson DA** 2005 Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. *Aquaculture Research* **36** 1488-1499.

**Seaborn GT, Smith TIJ, Denson MR, Walker AB & Berlinsky DL** 2009 Comparative fatty acid composition of eggs from wild and captive black seabass, *Centropristis striata* L. *Aquaculture Research* **40** 656-668.

**Sorbera LA, Asturiano JF, Carrillo M & Zanuy S** 2001 Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in a marine Teleost, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction* **64** 382-389.

**Stocco DM, Wang X, Jo Y & Manna PR** 2005 Multiple signalling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Molecular Endocrinology* **19** 2647-2659.

**Tocher DR, Bendiksen EA, Campbell PJ & Bell JG** 2008 The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture* **280** 21-34.

**Tocher DR, Agaba M, Hastings N, Bell JG, Dick JR & Teale AJ** 2002 Nutritional regulation of hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition in zebrafish (*Danio rerio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiology Biochemistry* **24** 309-320.

**Tocher DR** 2003 Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* **11** 107-184.

**Tukey JW** 1977 *Exploratory Data Analysis*. New York: Addison Wesley; 1977:39-43

**Tyler CR, Sumpter JP, Kawauchi H & Swanson P** 1991 Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* **84** 291-299.

**Van Der Kraak G & Chang JP** 1990 Arachidonic acid stimulates steroidogenesis in goldfish pre-ovulatory ovarian follicles. *General and Comparative Endocrinology* **77** 221-228.

**Wade MG & Van Der Kraak G** 1993 Regulation of prostaglandin E and F production in the goldfish testis. *Journal of Experimental Zoology* **266** 108-115.

**Wassef EA, Wahbi OM & Shalaby SH** 2011 Effects of dietary vegetable oils on liver and gonad fatty acid metabolism and gonad maturation in gilthead seabream (*Sparus aurata*) males and females. *Aquaculture International* volume 1-27. Não publicado

**Westerfield, M.** 1995 The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 3rd Edition. Eugene, OR, University of Oregon Press, 385.

**Wilson R** 2009 Dietary effects of n-3 highly unsaturated fatty acid levels on egg and larval quality, and the fatty acid composition of the eggs of Chilean flounder *Paralichthys adspersus* broodstock. *Aquaculture Research* **40** 1400-1409.

**Yanes-Roca C, Rhody N, Nystrom M & Main KL** 2009 Effects of fatty acid composition and spawning season patterns on egg quality and larval survival in common snook (*Centropomus undecimalis*). *Aquaculture* **287** 335-340.

**Zakeri M, Kochanian P, Marammazi JG, Yavari V, Savari A & Haghi M** 2011 Effects of dietary n-3 HUFA concentrations on spawning performance and fatty acids composition of broodstock, eggs and larvae in yellowfin sea bream, *Acanthopagrus latus*. *Aquaculture* **310** 388-394.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A - Tabelas de Análise de Variância

#### 1 Análise de ácidos graxos nas gônadas de fêmeas de zebrafish.

Tabela1 Análise de variância do nível de ácido Palmítico nas gônadas.

ANAVA PALMÍTICO						
Fonte de Variação	DF	SQ	QM	F	Prob l	Poder ( $\alpha=0.05$ )
A: TRAT	3	41.625	13.875	2.31	0.103167	0.507013
S(A)	23	138.2449	6.010649			
Total (Ajust.)	26	179.8699				
Total	27					
* Significante com $\alpha = 0.05$						

Tabela 2 Análise de variância do nível de ácido Esteárico nas gônadas.

ANAVA ESTEÁRICO						
Fonte de Variação	DF	SQ	QM	F	Prob l	Poder ( $\alpha=0.05$ )
A: TRAT	3	24.28089	8.093631	8.30	0.000642*	0.980096
S(A)	23	22.4416	0.9757218			
Total (Ajust.)	26	46.72249				
Total	27					
* Significante com $\alpha = 0.05$						

Tabela 3 Análise de variância do nível de ácido Oléico nas gônadas

<b>ANAVA OLEICO</b>						
<b>Fonte de Variação</b>	<b>DF</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>Prob l</b>	<b>Poder (<math>\alpha=0.05</math>)</b>
A: TRAT	3	1065.393	355.1309	13.42	0.000029*	0.999425
S(A)	23	608.815	26.47022			
Total (Ajust.)	26	1674.208				
Total	27					

\* Significante com  $\alpha = 0.05$

Tabela 4 Análise de variância do nível de ácido Linoléico nas gônadas.

<b>ANAVA LINOLÉICO</b>						
<b>Fonte de Variação</b>	<b>DF</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>Prob l</b>	<b>Poder (<math>\alpha=0.05</math>)</b>
A: TRAT	3	654.5947	218.1982	41.04	0.000000*	1.000000
S(A)	23	122.2876	5.316852			
Total (Ajust.)	26	776.8823				
Total	27					

\* Significante com  $\alpha = 0.05$

Tabela 5 Análise de variância do nível de ácido Linolênico nas gônadas.

<b>ANAVA LINOLÊNICO</b>						
<b>Fonte de Variação</b>	<b>DF</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>Prob l</b>	<b>Poder (<math>\alpha=0.05</math>)</b>
A: TRAT	3	433.0883	144.3627	41.14	0.000000*	1.000000
S(A)	23	80.71201	3.509218			
Total (Ajust.)	26	513.8003				
Total	27					

\* Significante com  $\alpha = 0.05$

Tabela 6: Análise de variância do nível de ácido Araquidônico nas gônadas.

<b>ANAVA ARA</b>						
<b>Fonte de Variação</b>	<b>DF</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>Prob l</b>	<b>Poder (<math>\alpha=0.05</math>)</b>
A: TRAT	3	1.465305	0.4884351	4.31	0.015011*	0.799393
S(A)	23	2.608732	0.1134231			
Total (Ajust.)	26	4.074038				
Total	27					

\* Significante com  $\alpha = 0.05$

Tabela 7 Análise de variância do nível de ácido Eicosapentaenóico nas gônadas.

<b>ANAVA EPA</b>						
<b>Fonte de Variação</b>	<b>DF</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>Prob l</b>	<b>Poder (<math>\alpha=0.05</math>)</b>
A: TRAT	3	145.8888	48.62961	28.44	0.000000*	1.000000
S(A)	23	39.33333	1.710145			
Total (Ajust.)	26	185.2222				
Total	27					

\* Significante com  $\alpha = 0.05$

Tabela 8 Análise de variância do nível de ácido Docosaexaenóico nas gônadas.

<b>ANAVA DHA</b>						
<b>Fonte de Variação</b>	<b>DF</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>Prob l</b>	<b>Poder (<math>\alpha=0.05</math>)</b>
A: TRAT	3	23.12713	7.709043	0.86	0.475208	0.207596
S(A)	23	205.8735	8.951022			
Total (Ajust.)	26	185.2222				
Total	27					

\* Significante com  $\alpha = 0.05$

### 1.1 Análise de ácidos graxos na carcaça de fêmeas de zebrafish

Tabela 9 Análise de variância do nível de ácido Palmítico na carcaça.

ANAVA Palmítico						
Fonte de Variação	DF	SQ	QM	F	Prob l	Poder ( $\alpha=0.05$ )
A: TRAT	3	140.1471	46.71569	13.29	0.000065*	0.999082
S(A)	19	66.76357	3.513872			
Total (Ajust.)	22	206.9106				
Total	23					

\* Significante com alpha = 0.05

Tabela 10 Análise de variância do nível de ácido Esteárico na carcaça.

ANAVA Esteárico						
Fonte de Variação	DF	SQ	QM	F	Prob l	Poder ( $\alpha=0.05$ )
A: TRAT	3	0.7343535	0.2447845	1.06	0.390334	0.241146
S(A)	19	4.398085	0.2314782			
Total (Ajust.)	22	5.132438				
Total	23					

\* Significante com alpha = 0.05



Tabela 11 Análise de variância do nível de ácido Oléico na carcaça

ANAVA Oleico						
Fonte de Variação	DF	SQ	QM	F	Prob l	Poder ( $\alpha=0.05$ )
A: TRAT	3	1811.64	603.8799	78.34	0.000000*	0.000000*
S(A)	19	146.4525	7.708026			
Total (Ajust.)	22	1958.092				
Total	23					

\* Significante com  $\alpha = 0.05$

Tabela 12 Análise de variância do nível de ácido Linoléico na carcaça

ANAVA Linoléico						
Fonte de Variação	DF	SQ	QM	F	Prob l	Poder ( $\alpha=0.05$ )
A: TRAT	3	969.3444	323.1148	428.41	0.000000*	1.000000
S(A)	19	14.3301	0.754216			
Total (Ajust.)	22	983.6746				
Total	23					

\* Significante com  $\alpha = 0.05$

Tabela 13 Análise de variância do nível de ácido Linolênico na carcaça

ANAVA Linolênico						
Fonte de Variação	DF	SQ	QM	F	Prob l	Poder ( $\alpha=0.05$ )
A: TRAT	3	1255.108	418.3694	116.65	0.000000*	1.000000
S(A)	19	68.14655	3.58666			
Total (Ajust.)	22	1323.255				
Total	23					

\* Significante com  $\alpha = 0.05$

Tabela 14 Análise de variância do nível de ácido Araquidônico na carcaça

ANAVA ARA						
Fonte de Variação	DF	SQ	QM	F	Prob l	Poder ( $\alpha=0.05$ )
A: TRAT	3	0.455955	0.1519851	1.96	0.154938	0.423816
S(A)	19	1.476601	7.771584E-02			
Total (Ajust.)	22	1.932556				
Total	23					

\* Significante com  $\alpha = 0.05$

Tabela 15 Análise de variância do nível de ácido Eicosapentaenóico na carcaça

<b>ANAVA EPA</b>						
<b>Fonte de Variação</b>	<b>DF</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>Prob l</b>	<b>Poder (<math>\alpha=0.05</math>)</b>
A: TRAT	3	90.05151	30.01717	57.46	0.000000*	1.000000
S(A)	19	9.925495	0.5223945			
Total (Ajust.)	22	99.97701				
Total	23					

\* Significante com  $\alpha = 0.05$

Tabela 16 Análise de variância do nível de ácido Docosaexaenóico na carcaça

<b>ANAVA DHA</b>						
<b>Fonte de Variação</b>	<b>DF</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>Prob l</b>	<b>Power (<math>\alpha=0.05</math>)</b>
A: TRAT	3	27.15984	9.053281	5.64	0.006165*	0.889348
S(A)	19	30.52184	1.606412			
Total (Ajust.)	22	57.68168				
Total	23					

\* Significante com  $\alpha = 0.05$

### 1.3 Análise de estradiol corporal em fêmeas de zebrafish

Tabela 17 Análise de variância para estradiol-

<i>Fonte de variação</i>	<i>Soma de quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>F</i>	<i>P-Valor</i>
COVARIÁVEL					
Peso	17331.	1	17331.	3.58	0.0780
EFEITOS PRINCIPAIS					
A:trat	40955.	3	13652.	2.82	0.0747
RESIDUAL	72665.	15	4844.4		
TOTAL (CORRIGIDO)	1.3315E5	19			

### 1.4 Análise do desenvolvimento embrionário de zebrafish

#### 1.4.1 Desenvolvimento embrionário no período de 8-9hpf

Tabela 18 Estatística resumida para desenvolvimento embrionário no período de 8-9hpf

<i>A.dietas</i>	<i>avaliações</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Coef. de variação</i>
OLV	11	1.20273	0.0180018	0.134171	11.1556%
LIN	8	1.25625	0.0228839	0.151274	12.0417%
FIS	12	1.30667	0.00169697	0.0411943	3.15262%
CRN	10	1.412	0.0378178	0.194468	13.7725%
Total	41	1.29463	0.0235855	0.153576	11.8625%

Tabela19 ANAVA para os scores de desenvolvimento no período de 8 a 9hph

<i>Fonte</i>	<i>Soma de quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>F</i>	<i>P-Valor</i>
Entre grupos	0.244187	3	0.0813957	4.31	0.0106
Dentro de grupos	0.699232	37	0.0188982		
Total (Corr.)	0.94342	40			

Tabela 20 Teste de Kruskal-Wallis para os escores de desenvolvimento no período 8 a 9hph

<i>dietas</i>	<i>Tamanho de amostra</i>	<i>Rank</i>
OLV	11	12.2273
LIN	8	20.25
FIS	12	21.9583
CRN	10	30.1

Estadística do teste = 12.1226P-Valor = 0.00697456

#### 1.4.2 Desenvolvimento embrionário no período de 23-25

Tabela 21 Estatística resumida para desenvolvimento embrionário no período de 23 a 25hpf

<i>A.dietas</i>	<i>avaliações</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Coef. de variação</i>
OLV	9	2.69667	0.05445	0.233345	8.6531%
LIN	7	2.75143	0.0117143	0.108233	3.93369%
FIS	8	2.78375	0.0155411	0.124664	4.47827%
CRN	6	2.97167	0.0736167	0.271324	9.13036%
Total	30	2.78767	0.043784	0.209246	7.50615%

Tabela22 ANAVA para os scores de desenvolvimento no período de 23-25hpf

<i>Fonte</i>	<i>Soma de quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>F</i>	<i>P-Valor</i>
Entre grupos	0.28698	3	0.09566	2.53	0.0791
Dentro de grupos	0.982757	26	0.0377983		
Total (Corr.)	1.26974	29			

Tabela 23 Teste de Kruskal-Wallis para os escores de desenvolvimento no período de 23-25hpf

<i>dietas</i>	<i>Tamanho de amostra</i>	<i>Rank</i>
OLV	9	11.3889
LIN	7	14.3571
FIS	8	16.5
CRN	6	21.6667

Estatística do teste = 5.33698P-Value = 0.148718

#### 1.4.3 Desenvolvimento embrionário no período de 30-36hpf

Tabela 24 Estatística resumida para desenvolvimento embrionário no período de 30 a 36hph

<i>A.dietas</i>	<i>avaliação</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Coef. de variação</i>
OLV	10	3.519	0.183899	0.428834	12.1863%
LIN	6	3.70667	0.491187	0.700847	18.9077%
FIS	9	3.64667	0.395425	0.628828	17.2439%
CRN	6	3.94167	0.708977	0.842008	21.3617%
Total	31	3.67419	0.383418	0.619208	16.8529%

Tabela25 ANAVA para os scores de desenvolvimento no período de 30-36 dph

<i>Fonte</i>	<i>Soma de quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>F</i>	<i>P-Valor</i>
Entre grupos	0.683248	3	0.227749	0.57	0.6406
Dentro de grupos	10.8193	27	0.400715		
Total (Corr.)	11.5026	30			

Tabela 26 Teste de Kruskal-Wallis para os escores de desenvolvimento no período de 30- 36hph

<i>dietas</i>	<i>Tamanho de amostra</i>	<i>Rank</i>
OLV	10	14.1
LIN	6	17.1667
FIS	9	15.5
CRN	6	18.75

Estadística do teste = 1.16614P-Valor = 0.761135

#### 1.4.4 Desenvolvimento embrionário no período de 48-36hpf

Tabela 27 Estatística resumida para desenvolvimento embrionário no período de 48 a 53hpf

<i>dietas</i>	<i>avaliações</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Coef. de variação</i>
OLV	6	6.00833	0.760417	0.872019	14.5135%
LIN	6	6.24	0.5494	0.741215	11.8784%
FIS	6	5.875	0.86195	0.928413	15.8028%
CRN	6	6.76667	1.41703	1.19039	17.592%
Total	24	6.2225	0.900967	0.949193	15.2542%

Tabela28 ANAVA para os scores de desenvolvimento no período de 48 a 53hpf

<i>Fonte</i>	<i>Soma de quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>F</i>	<i>P-Valor</i>
Entre grupos	2.77828	3	0.926094	1.03	0.3996
Dentro de grupos	17.944	20	0.897198		
Total (Corr.)	20.7222	23			

Tabela 29 Teste de Kruskal-Wallis para os escores de desenvolvimento no período de 48 a 53hpf

<i>dietas</i>	<i>Tamanho de amostra</i>	<i>Rank</i>
OLV	6	11.4167
LIN	6	12.0
FIS	6	10.6667
CRN	6	15.9167

Estadística do teste = 1.98189P-Valor = 0.57617

### 1.5 Taxa de Eclosão

Tabela 30 Estatística resumida para taxa de eclosão

<i>Dietas</i>	<i>Avaliações</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Coef. de variação</i>
OLV	11	45.9545	188.823	13.7413	29.9019%
LIN	8	56.525	326.262	18.0627	31.9553%
FIS	10	66.77	480.707	21.925	32.8366%
CRN	10	52.46	203.929	14.2804	27.2215%
Total	39	55.1282	334.253	18.2826	33.1638%

Tabela 31 ANAVA para taxa de eclosão

<i>Fonte</i>	<i>Soma de quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>F</i>	<i>P-Valor</i>
Entre grupos	2367.83	3	789.277	2.67	0.0623
Dentro de grupos	10333.8	35	295.251		
Total (Corr.)	12701.6	38			



## 1.6 Medição dos embriões

Tabela 32 ANAVA para diâmetro maior 8-9hpf

<i>Fonte</i>	<i>Soma de quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>F</i>	<i>P-Valor</i>
Entre grupos	1.15808	3	0.386026	4.76	0.0105
Dentro de grupos	1.78472	22	0.0811238		
Total (Corr.)	2.9428	25			

Tabela 33 ANAVA para diâmetro menor 8-9hpf

<i>Fonte</i>	<i>Soma de quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>F</i>	<i>P-Valor</i>
Entre grupos	1.72579	3	0.575264	9.32	0.0004
Dentro de grupos	1.35865	22	0.0617566		
Total (Corr.)	3.08444	25			