

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**MATURAÇÃO E FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS
ESTÁDIO III DE ZEBRAFISH**

LAURA ARNT SILVA
Médica Veterinária/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia
Área de concentração Produção Animal

Porto Alegre (RS), Brasil
20 de maio, 2015

CIP - Catalogação na Publicação

⊕ Arnt Silva, Laura
MATURAÇÃO E FERTILIZAÇÃO IN VITRO DE OOCITOS
ESTADIO III DE ZEBRAFISH / Laura Arnt Silva. --
2015.
46 f.

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2015.

1. Fertilização in vitro. 2. Maturação in vitro. 3.
LH e FSH. 4. hipófise de carpa. 5. Hormônios
gonadotrópicos. I. Pedro Streit Jr, Danilo, orient.
II. Título.

LAURA ARNT SILVA
Médica Veterinária

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRA EM ZOOTECNIA

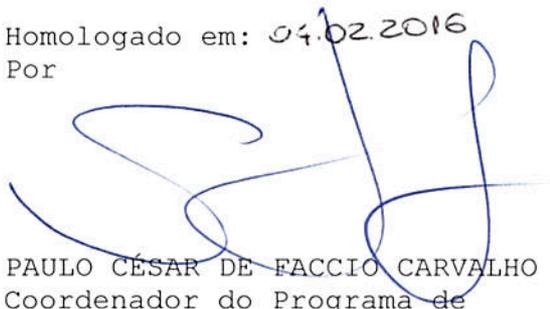
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 29.05.2015
Pela Banca Examinadora



DANILO PEDRO STREIT JUNIOR
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

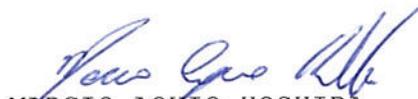
Homologado em: 04.02.2016
Por



PAULO CÉSAR DE FACCIO CARVALHO
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia


ENEDER ROSANA OBERST
UFRGS


LEONARDO JOSÉ GIL BARCELLOS
UPF - Passo Fundo/RS


MARCIO AQUIO HOSHIBA
UNIPAMPA


PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de Agronomia

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família pelo apoio incondicional em todos os momentos deste projeto. A eles, que me levantam nas quedas e me sustentam quando estou de pé.

AGRADECIMENTOS

Aos membros do Departamento e do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRGS, em especial à Ione Borcelli Gonçalves pela atenção e auxílio.

Ao Prof. Dr. Danilo P. Streit Jr. pela orientação e oportunidade de desenvolvimento acadêmico e pessoal.

Ao Prof. Dr. José Luiz Rigo Rodrigues, o Juca, por fornecer a estrutura para que o projeto fosse realizado.

A minha família que é o bem mais precioso que tenho.

Ao André Luiz Watanabe, meu amor, pela ajuda no desenvolvimento da idéia, pelo companheirismo, pela paciência, por tolerar meus dias difíceis e por tornar a minha jornada mais suave.

A minha colega e amiga Lis Marques, pela amizade, pelos ensinamentos, pela paciência e pelos muitos momentos de risadas e descontração.

Aos meus queridos amigos, pela lealdade e amizade. Em especial a Carol Fockink pela revisão da versão em inglês.

A Lidiane Eloy pelo auxílio na estatística do experimento.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite para colaborar com este trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos os meus colegas de pós-graduação e bolsistas do grupo AQUAM da faculdade de Zootecnia e Agronomia da UFRGS.

Agradeço a todas as dificuldades que enfrentei, pois se não fossem elas eu não teria obtido mais esta conquista.

EPÍGRAFE

*“Não há invenção mais rentável que a do
conhecimento”.*

(Benjamin Franklin)

MATURAÇÃO E FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS ESTÁDIO III DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)¹

Autor: Laura Arnt Silva

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

RESUMO

Protocolos de sucesso para a maturação *in vitro* de oócitos de peixe são importantes, uma vez que é necessário para garantir uma fertilização bem sucedida, formação do zigoto, crescimento do embrião e seu completo desenvolvimento. Em algumas espécies, a eficiência deste processo ainda é muito baixa ou restrita a poucas substâncias que podem ser utilizadas. Assim, pesquisou-se a utilização de hormônios alternativos ao protocolo já existente para maturação *in vitro* de ovócitos de zebrafish. O objetivo foi avaliar a eficiência do extrato de hipófise de carpa (EHC), dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) para fazer a maturação dos ovócitos estágio III de zebrafish. Os oócitos estágio III foram colocados em meio de cultivo Leibovitz modificado, suplementado com soro fetal bovino e adicionado o hormônio correspondente a seu tratamento (T1-controle; T2-16 µg/ml de EHC; T3- 32 µg/ml de EHC; T4- 48 µg/ml de EHC; T5- 64 µg/ml de EHC; T6- 80 µg/ml de EHC; T7- 0,5 µg/ml de FSH; T8- 0,5 µg/ml de LH e T9- 0,5 µg/ml de FSH e 0,5 µg/ml de LH). A taxa de maturação foi avaliada através da visualização da quebra da vesícula germinal (GVBD). Em todos os tratamentos houve maturação, embora o EHC tenha demonstrado taxas de maturação muito baixas (T2= 12,8%; T3=24,8%; T4=27%; T5=22,7%; T6=9,7%) e inferiores em relação a maior eficiência dos hormônios gonadotrópicos (T7=16%; T8=35%; T9=50%). Além disso foi possível verificar a viabilidade dos oócito através da fertilização *in vitro* do melhor tratamento (T9) com uma taxa de eclosão e desenvolvimento em larva de 60%. Os resultados da maturação *in vitro* utilizando estes indutores hormonais em oócitos estágio III de zebrafish mostraram-se promissores, e reforçam as perspectivas para o aprimoramento e uso desta técnica para produção *in vitro* de embriões viáveis.

Palavras-chave: fertilização, FSH, LH, folículos ovarianos, hipófise de carpa, hormônios gonadotrópicos.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (46 p.). Maio, 2015.

IN VITRO MATURATION AND FERTILIZATION OF OOCYTES STAGE III IN ZEBRAFISH (DANIO RERIO)²

Author: Laura Arnt Silva

Supervisor: Danilo Pedro Streit Jr.

ABSTRACT

Successful protocols for maturation of oocytes are important, as it is necessary for ensuring successful fertilization, zygote formation, embryo growth and full development. In some species the efficiency of *in vitro* maturation is still very low or is still restricted to a little amount of substances which can be used for the matter. Thus, we studied the use of alternative hormones to the existing protocol for *in vitro* maturation of zebrafish oocytes. The aim of this study was to evaluate the efficiency of the use of carp pituitary extract (CPE), the follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) to oocyte maturation stage III of zebrafish. Oocytes stage III were placed in modified Leibovitz culture medium, supplemented with fetal bovine serum and added to the corresponding hormone treatment (T1-control; T2-16 g / ml of CHE; T3 32 g / ml of CHE, T4 - 48 g / ml of CHE; T5- 64 g / ml of CHE; T6- 80 g / ml of CHE; T7- 0.5 g / ml of FSH, T8 0.5 mg / ml of LH and T9- 0.5 g / ml of FSH and 0.5 mg / ml LH). The maturation rate was assessed by the germinal vesicle break down (GVBD). In all cases there was maturation, though the EHC has demonstrated fairly low maturation rate (T2= 12,8%; T3=24,8%; T4=27%; T5=22,7%; T6=9,7%) and lower in relation of the high efficiency presented by the gonadotropic hormones (T7=16%; T8=35%; T9=50%). In addition it was possible to verify the viability of the oocyte through IVF of the best treatment (T9) with a result of 60% of hatching and larvae development rate. The results of maturation in turn using this hormones in stage III oocytes of zebrafish proved promising, and enhance the prospects for improvement and use of this technique for *in vitro* production of viable embryos.

Keywords: fertilization, FSH, LH, ovarian follicles, carp pituitary, gonadotropic hormones.

² Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (46 p.). Maio, 2015.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	11
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Reprodução em peixes	13
2.2. Crescimento folicular.....	14
2.3. Controle hormonal da maturação oocitária	15
2.4. Reprodução induzida e utilização do extrato de hipófise de carpa	16
2.5. Maturação e fertilização <i>in vitro</i>	17
2.6. Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) como modelo biológico.....	19
3. HIPÓTESES	21
4. OBJETIVOS.....	22
CAPÍTULO II	23
1. ARTIGO.....	24
1.1. Introdução	25
1.2. Materiais e Métodos.....	27
1.3. Resultados	29
1.4. Discussão.....	32
CAPÍTULO III	38
1. CONCLUSÕES.....	39
2. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

RELAÇÃO DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA 1. Estádios de desenvolvimento oocitário em zebrafish (*Danio rerio*). (I) crescimento primário; (II) cortical-alveolar; (III) vitelogênese; (IV) maturação; e (V) maturo. 15

FIGURA 2. Dimorfismo sexual em zebrafish, macho (A) e fêmea (B)..... 21

CAPÍTULO II

FIGURA 1. Taxa de maturação dos oócitos tratados com diferentes hormônios, LH, FSH e FSH+LH incubados por um período de 24 horas com temperatura controlada de 27°C. Letras distintas diferem-se estatisticamente, $p < 0,001$, dentre de um mesmo intervalo de tempo..... 31

FIGURA 2. Taxa de maturação dos oócitos tratados com diferentes hormônios, LH, FSH e FSH+LH incubados por um período de 24 horas com temperatura controlada de 27°C. Letras distintas diferem-se estatisticamente, $p < 0,001$, dentre de um mesmo intervalo de tempo.....32

FIGURA 3. Curva de regressão da taxa de maturação *in vitro* dos oócitos de zebrafish utilizando extrato de hipófise de carpa.....33

LISTA DE ABREVIATURAS

%	percentagem
±	mais ou menos
=	igual a
<	menor que
>	maior que
µg	micrograma(s)
µm	micrômetro(s)
µL	microlitro(s)
°C	graus Céluis
17 α -20 β DHP	17 α, 20 β dihidroxi-4-pregnen-3-one
DHP	17 α, 20 β dihidroxi-4-pregnen-3-one
EHC	extrato de hipófise de carpa
FSH	follicle stimulating hormone (hormônio folículo estimulante)
g	grama(s)
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
GV	vesícula germinativa
GVBD	quebra da vesícula germinativa
h	hora
LH	luteinizing hormone (hormônio luteinizante)
IVC	<i>in vitro</i> culture (cultivo <i>in vitro</i>)
mg	miligrama(s)
min	minuto(s)
ml	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
P	probabilidade de erro

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

As biotécnicas utilizadas na reprodução animal avançaram significativamente na última década. No entanto, essas metodologias são dependentes da tecnologia básica da produção *in vitro* de oócitos maduros para fertilização e produção de embriões. Embora elas já estejam bem avançadas em mamíferos, pesquisas para a evolução destas técnicas em peixes são necessárias para aprimorar o conhecimento sobre embriologia e o mecanismo de ação dos hormônios que estão envolvidos na maturação *in vitro* e *in vivo*.

A maturação é um processo longo durante o qual os oócitos desenvolvem competência para serem fertilizados e então originarem novos indivíduos. A habilidade que esta estrutura tem de ser fertilizada é dependente do estágio de desenvolvimento em que se encontra, visto que os estágios mais primordiais não estão aptos ainda a produzir um novo indivíduo. Em teleósteos, como nos vertebrados superiores, a maturação final do oócito ocorre antes da ovulação e consiste na migração e discriminação da vesícula germinal, condensação do cromossoma e a formação do primeiro corpo polar (Goetz, 1983).

A interdependência de cada etapa na sequência de maturação *in vitro* é uma das dificuldades encontradas para aprimoramento dessa tecnologia. Atualmente dispõe-se de um protocolo padronizado utilizando o hormônio 17α - 20β -diidrox-4-pregnen-3-ona (17α - 20β DHP), que é eficaz na indução da maturação *in vitro* de inúmeras espécies de peixes (Seki, 2008). Entretanto a utilização de outros hormônios indutores da maturação *in vitro* como o folículo estimulante (FSH), o luteinizante (LH) ou mesmo o uso do extrato de hipófise de carpa (EHC), podem ser alternativas para o desenvolvimento de novos protocolos.

O zebrafish (*Danio rerio*) tornou-se um importante modelo no estudo de genética, biologia do desenvolvimento e biomedicina (Kalueff et al., 2014). Ele tem um papel cada vez mais expressivo na área da pesquisa médica uma vez que o genoma do zebrafish possui semelhanças com o genoma humano (Howe et al., 2013), entre outras vantagens como a facilidade de manejo, menor custo, alta fecundidade, tempo entre gerações rápido e transparência óptica durante a embriogênese. Assim, o zebrafish é uma alternativa promissora como modelo biológico para otimizar os protocolos de maturação *in vitro*.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho da utilização do extrato de hipófise de carpa (EHC), dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) na maturação dos ovócitos estágio III de zebrafish (*Danio rerio*).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Reprodução em peixes

A reprodução dos peixes, assim como dos demais animais, é viabilizada pela formação dos gametas através do processo de divisão celular conhecida como meiose. Neste processo são geradas células filhas (gametas) que contém metade do conteúdo de DNA existente na célula mãe, ou seja, cada gameta normal contém uma única cópia do genoma da espécie. Em ovários de mamíferos, a divisão mitótica das células germinativas se completa antes do nascimento. Assim, o número de oócitos a ser ovulado é limitado ao número de folículos primordiais que são gerados durante a embriogênese. Em contraste, em vertebrados não mamíferos com elevada fecundidade, como o zebrafish, o número de oócitos pode ser infinito (Draper et al., 2007). No ovário adulto destas espécies, as células germinativas mitóticas têm características citológicas de oogônias, assim a formação de oócitos ocorre continuamente ao longo da vida (Nakamura et al., 2011).

Estudos referentes à biologia reprodutiva e ao desenvolvimento inicial dos gametas são importantes para o estabelecimento de medidas de conservação da ictiofauna, o desenvolvimento da piscicultura brasileira, pesquisas básicas e biomédicas, além da possibilidade de desenvolvimento de novos protocolos reprodutivos que possam ser aplicados para diferentes mamíferos através do uso de modelos experimentais.

Na maioria dos peixes teleósteos, ovários e testículos são órgãos pares, alongados, fusiformes, localizados na cavidade celomática, lateralmente a bexiga gasosa e dorsalmente ao tubo digestivo. Na região caudal, as gônadas direita e esquerda unem-se formando um ducto comum, que se abre na papila urogenital, localizada caudalmente à abertura anal. Microscopicamente, ovários são revestidos pela túnica albugínea, a qual emite septos para o interior do órgão formando lamelas ovulíferas, onde os oócitos se desenvolvem. Segundo de Vlaming (1983), o desenvolvimento oocitário pode ocorrer de três maneiras: 1) sincrônico, quando todos os oócitos desenvolvem-se simultaneamente, associado à espécies de desova única; 2) sincrônicos em grupo, quando oócitos desenvolvem-se em dois grupos distintos, sendo um grupo estoque de reserva para o próximo ciclo reprodutivo; este padrão é característico de espécies que desovam em estação reprodutiva de curta duração como os peixes de piracema; 3) assincrônicos, caracterizado pela presença de mais de dois lotes de oócitos em vários estádios de desenvolvimento, sem predominância de qualquer um deles e está associado a espécies que desovam várias vezes em uma estação reprodutiva prolongada. Estudos histológicos da estrutura ovariana do zebrafish descreveram o ovário do zebrafish como assíncrono (Çakıcı & Üçüncü, 2007; Koç & Akbulut, 2012; Connolly et al., 2014).

O zebrafish, assim como as demais espécies de peixes teleósteos, apresenta um par de ovários alongados localizados bilateralmente entre a parede abdominal e a bexiga nadatória. A estrutura é suspensa por um mesovário vascularizado e um curto oviduto que conduz os oócitos para o exterior (Menke et al., 2011). No corte histológico é possível visualizar os folículos ovarianos em diferentes estádios de desenvolvimento (Connolly et al., 2014).

Apesar de o zebrafish possuir sexos separados (gonocorísticos), eles são classificados como hermafroditas transitórios, pois no período larval entre 10 a 25 dias pós-fecundação, as gônadas inicialmente desenvolvem-se em ovários (Dranow et al., 2013). Em aproximadamente metade da população, o tecido ovariano posteriormente se degenera e é invadido por células somáticas, produzindo um estágio gonadal intersexual que resulta em um testículo (Devlin & Nagahama, 2002).

2.2. Crescimento folicular

A oogênese em teleósteos é um processo dinâmico, no qual ocorre a formação, crescimento e maturação dos oócitos.

O desenvolvimento oocitário em zebrafish é dividido em cinco estádios baseado em critérios morfológicos, fisiológicos e eventos bioquímicos (Selman, 1993). O *estádio I* corresponde ao crescimento primário; o *estádio II*, a fase cortical alveolar; o *estádio III*, a fase de vitelogênese; o *estádio IV*, a fase maturação e o *estádio V* ao oócito maduro que está apto a fertilização (Figura 1).

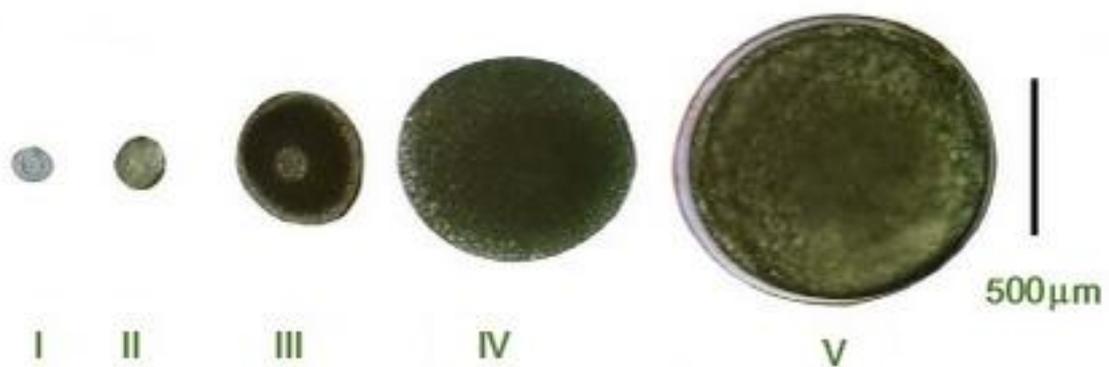


FIGURA 1. Estádios de desenvolvimento oocitário em zebrafish. (I) crescimento primário; (II) cortical-alveolar; (III) vitelogênese; (IV) maturação; e (V) maduro. Fonte: Lubzens et al., 2010

O estágio I (fase de crescimento primário) é dividido em duas fases: pré-folicular (diâmetro entre 7 e 20 μm) e folicular (diâmetro entre 20 e 140 μm). Na fase pré-folicular, o oócito encontra-se circundado por uma única camada de células pré-foliculares e o núcleo deste oócito é grande em relação ao citoplasma. Em leptóteno, a cromatina apresenta um aspecto filamentososo e numerosos pequenos nucléolos são visíveis. Devido a essa configuração, alguns autores classificam essa fase como cromatina-núcleo (Lubzens et al., 2010). Com o avanço da meiose, com os oócitos em zigóteno prosseguindo para paquíteno, os cromossomos se tornam mais visíveis. Na fase folicular, no início de diplóteno, os oócitos são individualizados pelas células pré-foliculares que rompem os cistos, formando os folículos ovarianos. Os oócitos se desenvolvem dentro de folículos ovarianos e apresentam múltiplos nucléolos, que se dispõem perifericamente, junto ao envoltório nuclear. Essa conformação, também confere a fase outra nomenclatura chamada perinuclear (Lubzens et al., 2010). Durante esta fase ocorre uma intensa proliferação de organelas, diferenciação das células foliculares e tecais e o citoplasma se apresenta levemente basofílico devido ao acúmulo de RNA (Selman & Wallace, 1989).

No estágio II (fase alvéolo cortical), os oócitos são distinguidos pelo aparecimento de alvéolos corticais de tamanhos variáveis. Esta fase também foi denominada como vitelogênese primária. Os alvéolos corticais são vesículas de glicoproteínas limitadas por membranas e eles se localizam próximos aos complexos de Golgi, que se acredita participarem da síntese de seu conteúdo. À medida que o oócito aumenta, os alvéolos corticais, aumentam em número e tamanho, preenchendo o citoplasma. Células especializadas aparecem na teca e pressupõe-se que elas secretam os esteróides necessários para o crescimento do oócito.

No estágio III (vitelogênese), vitelogeninas hepáticas induzida por esteróides são sequestradas pelos oócitos através de endocitose. As vitelogeninas são glicoproteínas de fosfolípidos que contribuem para a produção de proteínas que são essenciais para o desenvolvimento embrionário (Connolly et al., 2014). O oócito continua perdendo sua basofilia, o folículo se torna mais opaco e a vesícula germinal é completamente visível (Wallace & Selman, 1989). Os lípidos que se acumulam no citoplasma do oócito originam de lipoproteínas do plasma e das vitelogeninas (Lubzens et al., 2010). Ao final desta fase os folículos se tornam competentes para responder ao sinal hormonal e serem recrutados para maturação (Selman, 1993).

No estágio IV (maturação), a vesícula germinal (GV) migra para a periferia do oócito, ocorre a quebra da vesícula germinativa (GVBD) e o envelope nuclear rompe-se (Lessman, 2009).

No estágio V (maduro), os oócitos maduros são liberados no lúmen do ovário e estão prontos para serem fertilizados.

2.3. Controle hormonal da maturação oocitária

O eixo hipotálamo-hipófise-gônada desempenha um importante papel na gametogênese. Alterações de fatores ambientais, como fotoperíodo e temperatura, são detectados por receptores específicos, transmitidas ao cérebro e, após, para o hipotálamo, alterando a sua produção e liberação de hormônios. O hipotálamo produz, entre outros, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Este hormônio estimula a liberação pela adeno hipófise das gonadotrofinas: hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), cujos alvos encontram-se principalmente nas gônadas. Desta forma, o FSH atua na fase de crescimento oocitário, tendo um papel predominante na regulação do crescimento de folículos vitelogênicos, ativando a produção de estradiol (E2) pelos próprios folículos ovarianos, e regula o desenvolvimento do ovário através do controle da síntese de vitelogenina. O LH, por sua vez, atua na maturação ovocitária estimulando a secreção de 17α , 20β , dihydroxy-4-pregnen-3-one (17α - 20β DHP), o qual foi identificado como hormônio indutor da maturação, e é amplamente utilizado nos protocolos de maturação *in vitro* já estabelecidos.

2.4. Reprodução induzida e utilização do extrato de hipófise de carpa

O estudo do controle endócrino da reprodução de peixes passou a ser fundamental por representar uma possibilidade de intervenção específica na reprodução destes animais. Desta forma, a reprodução artificial da maioria das espécies de peixes é otimizada pela indução hormonal, que possibilita a maturação final e liberação dos gametas de peixes mantidos em cativeiro, além de possibilitar maior eficiência da reprodução em condições laboratoriais (Carneiro, 2007). A técnica *in vivo* mais utilizada para a indução hormonal da maturação final de peixes é a utilização de extrato bruto de hipófise de peixes maduros (Zaniboni-Filho & Nuñez, 2004). Esta técnica recebe o nome de hipofisação, que funciona como um atalho no processo natural de maturação dos gametas.

Segundo Baldisserotto (2002), existem inúmeros hormônios que atuam direta ou indiretamente nas gônadas, possibilitando o seu desenvolvimento e posterior desova e espermição em cativeiro. Dentre eles encontram-se os antiestrógenos, o hormônio liberador de gonadotrofinas e esteróides. As gonadotrofinas são encontradas na glândula hipófise dos animais. Essa glândula produz, acumula e armazena os hormônios gonadotróficos, os quais desempenham um papel decisivo na reprodução. Em suma, ela faz o papel de intermediário entre o cérebro e a gônada.

A técnica de hipofisação consiste em utilizar hipófises de espécies doadoras que tenham alcançado o estágio de maturação gonadal, onde são encontrados níveis mais elevados de hormônios gonadotróficos. Segundo Woynarovich e Horváth (1983), peixes que são utilizados para extração da hipófise com o objetivo de indução à desova devem ter mais de dois anos e não ter participado de desovas induzida ou natural na temporada de reprodução. Usualmente utiliza-se extrato de hipófise extraído de carpas

adultas e sexualmente maduras, injetado por via intraperitoneal nos reprodutores, resultando na maturação final dos oócitos.

O extrato de hipófise de carpa (EHC) é amplamente utilizada na indução de inúmeras espécies de peixes, apresentando vantagens quando comparada com os hormônios sintéticos. Muito embora a carpa seja a maior doadora para este tipo de indutor hormonal, indivíduos sexualmente maduros de várias espécies de reofílicos também podem ser utilizados.

O extrato de hipófise de peixes utilizados na reprodução induzida, possui inúmeras vantagens; como sua simplicidade, pois não necessita de instalações (refrigeração) ou equipamentos e a dosagem é facilmente calculada baseado-se na relação entre o peso da hipófise do doador e o peso do receptor. As hipófises mais utilizadas na indução são as de carpa, provenientes da espécie *Cyprinus carpio*, que geralmente são importadas e possuem custo elevado (Pillay, 1990). O custo de 1 grama de hipófise é \$350,00 (Danúbio Aquacultura, 2015). No entanto, inúmeras pesquisas têm demonstrado que outras fontes de hipófises são eficientes (Bernardino et al., 1993; Amaral Jr., 1995; Streit Jr. et al., 2003; Souza et al., 2003), ao mesmo tempo que reduzem o custo do processo reprodutivo.

A quantidade de hormônio gonadotrópico necessária para induzir a maturação final e desova dos peixes depende do grau de maturação dos reprodutores, da espécie e do método escolhido para fazer a aplicação. Dessa forma, a dosagem ideal recomendada para induzir diferentes espécies pode ser bem distinta. Quando o hormônio utilizado é proveniente do extrato de hipófise, há ainda a variação da quantidade de gonadotropina presente na hipófise no momento da sua coleta, acrescida pela interferência que o processo de conservação pode oferecer na degradação do hormônio. No Brasil, o procedimento usual utiliza hipófise de carpa desidratada em acetona na dosagem de 5 a 6 mg de EHC por quilo de fêmea (Harvey e Carolsfeld, 1993).

Alguns estudos já relataram a utilização do EHC na maturação *in vitro* de oócitos (Goetz, 1983; Sorbera, 1999). Os hormônios gonadotróficos atingem a células alvo *in vivo* através de leitos capilar localizados na camada da teca em torno do folículo. No entanto, *in vitro*, elas devem atravessar a superfície do epitélio dos folículos, que pode ser impermeável a elas sob condições impróprias de cultivo. A composição do meio, pH, osmolaridade e tempo de incubação são cruciais para o sucesso da capacidade de resposta dos oócitos em responder aos hormônios (Patiño & Thomas, 1990).

Apesar de inúmeros estudos descreverem a regulação da maturação *in vitro* de oócitos em espécies de salmonídeos e não salmonídeos, muito pouco se sabe sobre a utilização do EHC na maturação do oócito de zebrafish.

2.5. Maturação e fertilização *in vitro*

As biotécnicas da reprodução, tais como a inseminação artificial, maturação, fecundação e produção de embriões *in vitro*, transferência de embriões e criopreservação de gametas são essenciais para o melhoramento reprodutivo e preservação da biodiversidade (Gobello, 2004).

A maturação é um processo longo durante o qual os oócitos desenvolvem competência para serem fertilizados e então originarem novos indivíduos. A habilidade que esta estrutura tem de ser fertilizada é dependente do estágio de desenvolvimento em que se encontra, visto que os estágios mais primordiais não estão aptos ainda a produzir um novo indivíduo.

A interdependência de cada etapa na sequência de maturação *in vitro* é uma das dificuldades encontradas para aprimoramento dessa tecnologia. Para mamíferos, meios de cultivo, protocolos hormonais e técnicas de cultivo já estão bem desenvolvidas. Para peixes estas tecnologias ainda estão em desenvolvimento, existindo poucos protocolos de maturação *in vitro* e estes ainda necessitam ser ajustados para cada espécie. O protocolo existente foi desenvolvido para o estágio III de oócitos de zebrafish devido ao seu uso como modelo experimental. Ele utiliza o hormônio $17\alpha - 20\beta$ DHP para maturação que, além de dificuldade para aquisição e armazenamento, é dispendioso.

Nos peixes, incluindo a truta (Jalabert 1976, Nagahama et al., 1980), goldfish (Jalabert 1976), perca amarela (Goetz & Theofan, 1976), salmão (Nagahama et al., 1980), medaka (Iwamatsu et al 1987) e zebrafish (Selman et al. 1993, 1994), o 17α - 20β -di-hidroxi-4-pregnen-3-ona (DHP) é eficaz como hormônio de indução da maturação *in vitro* de oócitos com vesícula germinativa completamente formada (estágio III). Apenas alguns estudos examinaram a capacidade de oócitos maturados para ser fertilizado e desenvolver até a eclosão (Seki et al.2008). Em zebrafish, Li et al. (1993) relataram um método para a maturação *in vitro* de oócitos na fase III, na qual os oócitos podem ser maturados, fertilizados e poderiam desenvolver-se a termo. Já o protocolo desenvolvido por Seki (2008) vem sendo amplamente utilizado.

Em mamíferos inúmeros métodos de maturação *in vitro* a partir do estágio de surgimento da vesícula germinativa já foram estabelecidos e são utilizados para compreender os mecanismos de regulação da oogenese e da foliculogenese, incluindo ratos (Cross & Brinster, 1970; Iwamatsu & Chang, 1972; Mukherjee, 1972), coelhos (Brackett et al., 1972), hamsters (Whittingham & Bavister, 1974), camundongos (Niwa & Chang, 1975; Niwa et al., 1976), vacas (Iritani & Niwa, 1977), e suínos (Iritani et al., 1978).

Protocolos bem sucedidos para a maturação de oócitos são importantes, uma vez que é necessário para garantir êxito na fertilização, formação do zigoto, realização de estágio de blastocisto, crescimento do embrião e do desenvolvimento. Os meios de cultivo desempenham um papel muito importante no desenvolvimento do sistema *in vitro*, uma vez que influenciam diretamente no seu sucesso (Gliedt et al, 1996). Em alguns peixes, o pH do ovário é mais alcalino (Fauvel et al., 1993, Lahnsteiner et al., 1995). Além disso, Patiño et al. (2005) observaram que condições alcalinas facilitaram a maturação *in vitro* de oócitos da fase III para a V em corvina (*Micropogonias*

undulatus). No entanto, nenhum desses estudos examinaram a capacidade do oócitos a ser fertilizados e para desenvolverem após a maturação *in vitro*. A osmolaridade do meio também afeta diretamente o resultado da maturação. Segundo Seki (2008) a utilização de 90% de meio Leibovitz L-15 deixou o meio com osmolaridade de 0,290 osm/kg. Esta osmolaridade estaria perto do valor isotônico dos oócitos de zebrafish. Este valor é semelhante ao encontrado por Iwamatsu (1987) para oócitos de medaka (0,270 Osm/kg, 90% TCM199).

Frazer et al (1999) relataram que o uso do soro fetal bovino (FBS) no meio de cultivo melhora o crescimento celular. O FBS já foi utilizado anteriormente em diferentes experimentos de cultivo celular em peixes em diferentes concentrações e demonstrando um aumento na taxa de crescimento celular (Goswami et al., 2010; Kumar et al., 2001) mas ainda não há trabalhos publicados com utilização em cultivo celular em zebrafish. Seki et al. (2008) demonstrou que o uso da albumina sérica bovina (BSA) foi eficaz na maturação citoplasmática dos oócitos de zebrafish, assim como é em oócitos humanos.

Sabe-se que o hormônio folículo estimulante (FSH) atua na foliculogese precoce e é essencial para um desenvolvimento adequado até à vitelogênese (Kwok et al., 2005). A presença do receptor de FSH em células da granulosa sugere que ele pode promover o desenvolvimento e crescimento folicular (Magalhães et al., 2009). Como as gonadotrofinas de peixes não estão disponíveis, os hormônios a partir de fontes de mamíferos têm sido comumente utilizados como alternativa em vários estudos em peixes (Kwok et al., 2005).

Em medaka, Iwamatsu (1973) relatou que oócitos imaturos tratados com hormônio luteinizante (LH) *in vitro* podem amadurecer, ser fertilizados, eclodir e se desenvolver em peixes adultos. Neste experimento os oócitos imaturos de medaka sofrem maturação citoplasmática, no entanto nenhum juvenil foi obtido. Assim, não está claro se o método utilizado para oócitos na fase de vesícula germinativa suportam maturação citoplasmática após tratamento com LH.

2.6. Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo biológico

O zebrafish (*Danio rerio*) é um teleósteo tropical de água doce, pertencente à família Cyprinidae e é caracterizada pelo pequeno tamanho, podendo atingir em torno de 4-5 cm de comprimento (Spence et al., 2008). Essa espécie apresenta dimorfismo sexual, na qual os machos são mais afilados e geralmente dourados na região ventral (Figura 3A), e as fêmeas são mais prateadas e arredondadas na região ventral (Figura 3B), o que é mais evidente na época da estação reprodutiva.

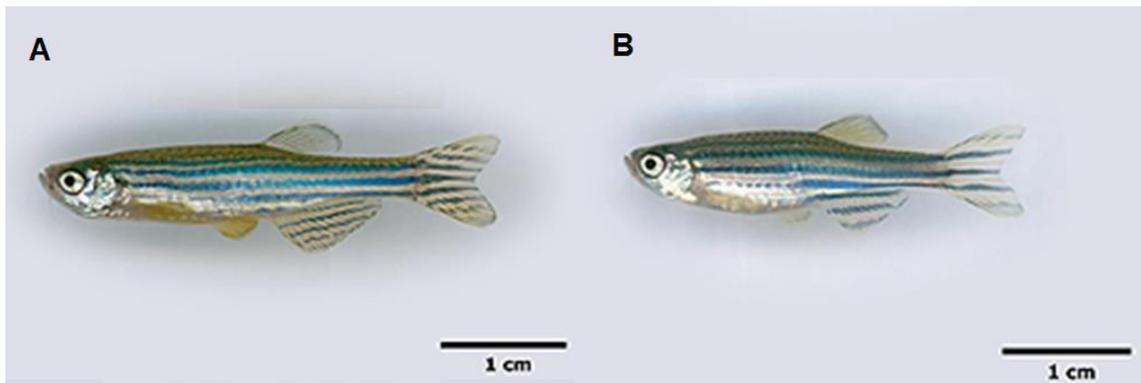


FIGURA 2. Dimorfismo sexual em zebrafish, macho (A) e fêmea (B).
Fonte: <http://wikisites.cityu.edu.hk/sites/newscentre/en/Pages/200606071538.aspx>

O zebrafish é um peixe ovíparo, ou seja, a fertilização e o desenvolvimento são externos. A maturidade sexual é atingida por volta de 10-12 semanas de vida (Detrich et al., 1999) e as fêmeas podem desovar a cada 2-3 dias, sendo que cada desova pode conter centenas de oócitos (Lawrence, 2007). Entre as vantagens dessa espécie como modelo experimental, está no fato de os embriões serem translúcidos, permitindo a visualização em tempo real de todos os estádios do desenvolvimento embrionário.

A popularidade do zebrafish como modelo biológico deve-se as suas características de alta fecundidade, pequeno tamanho, tempo entre gerações rápido, transparência óptica durante a embriogênese e homologia genética com humanos (Lawrence, 2007). Todas essas vantagens o tornaram um importante modelo vertebrado em inúmeras áreas de investigação, tais como a biologia do desenvolvimento, a fisiologia, a genética e a criobiologia (Squire et al., 2008; Bai et al., 2013). Seu custo de criação e manutenção é inferior a de outros animais utilizados na pesquisa, por exemplo, a criação de camundongos é cerca de três vezes maior que a de zebrafish (Lieschke & Currie, 2007) e pode chegar a ser mil vezes menor do que o custo de um rato (Goldsmith & Solari, 2003). Além disso, os métodos laboratoriais para sua criação e manejo já estão bem estabelecidos, e em condições laboratoriais simples podem produzir um grande número de ovos fertilizados diariamente (Westerfield, 2000). Assim, este tem sido considerado um peixe modelo ideal para o desenvolvimento de pesquisas.

3. HIPÓTESES

3.1. A maturação *in vitro* do oócito estágio III de zebrafish pode ser realizada utilizando extrato de hipófise de carpa;

3.2. A maturação *in vitro* do oócito estágio III de zebrafish pode ser realizada utilizando os hormônios gonadotrópicos FSH e LH;

3.3. O desenvolvimento de um protocolo de maturação *in vitro* utilizando hormônios alternativos é viável;

3.4. É possível produzir novos indivíduos a partir de oócitos maturados *in vitro*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Verificar a eficácia do extrato de hipófise de carpa (EHC), dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) na maturação *in vitro* dos oócitos estágio III de zebrafish (*Danio rerio*).

4.2. Objetivos específicos

Desenvolver um protocolo eficiente de maturação *in vitro* para estágio III de oócito de zebrafish utilizando EHC;

Desenvolver um protocolo eficiente de maturação *in vitro* para estágio III de oócito de zebrafish utilizando hormônios gonadotróficos FSH e LH;

Avaliar a capacidade de desenvolvimento folicular *in vitro* e a viabilidade após fertilização também *in vitro*;

CAPÍTULO II

¹ Artigo elaborado conforme normas da revista Fisheries Research.

1. ARTIGO

Maturação e fertilização *in vitro* do estágio III do oócito de zebrafish (*Danio rerio*)

Laura A. Silva^{1*}, Lis S. Marques¹, Tiantian Zhang², Danilo Streit Jr¹.

¹ Grupo Aquam, Departamento de Ciência Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

² Escola de Ciência Aplicada, Universidade de Bournemouth

* Correspondência: lolarnt@hotmail.com

Resumo

Protocolos de sucesso para a maturação *in vitro* de oócitos de peixe são importantes, uma vez que é necessário para garantir uma fertilização bem sucedida, formação do zigoto, crescimento do embrião e seu completo desenvolvimento. Em algumas espécies, a eficiência deste processo ainda é muito baixa ou restrito a poucas substâncias que podem ser utilizadas. Assim, pesquisou-se a utilização de hormônios alternativos ao protocolo já existente para maturação *in vitro* de oócitos de zebrafish. O objetivo foi avaliar a eficiência do extrato de hipófise de carpa (EHC), dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) para a maturação dos oócitos estágio III de zebrafish. Os oócitos estágio III foram colocados em meio de cultivo Leibovitz modificado, suplementado com soro fetal bovino e adicionado o hormônio correspondente a seu tratamento (T1-controle; T2-16 µg/ml de EHC; T3- 32 µg/ml de EHC; T4- 48 µg/ml de EHC; T5- 64 µg/ml de EHC; T6- 80 µg/ml de EHC; T7- 0,5 µg/ml de FSH; T8- 0,5 µg/ml de LH e T9- 0,5 µg/ml de FSH e 0,5 µg/ml de LH). A taxa de maturação foi avaliada através da visualização da quebra da vesícula germinal (GVBD). Em todos os tratamentos houve maturação, embora o EHC tenha demonstrado taxas de maturação muito baixas (T2= 12,8%; T3=24,8%; T4=27%; T5=22,7%; T6=9,7%) e inferiores ao obtido pelos hormônios gonadotrópicos (T7=16%; T8=35%; T9=50%). Além disso, foi possível verificar a viabilidade da fertilização *in vitro* somente dos oócito através tratamento 9 com uma taxa de eclosão de 68% e desenvolvimento em larva de 60%. Os resultados da maturação *in vitro* utilizando estes indutores hormonais em ovócitos estágio III de zebrafish mostraram-se promissores, e reforçam as perspectivas para o aprimoramento e uso desta técnica para produção *in vitro* de embriões viáveis.

Palavras-chave: fertilização, FSH, LH, folículos ovarianos, hipófise de carpa, hormônios gonadotrópicos.

***In vitro* maturation and fertilization of stage III oocytes in zebrafish (*Danio rerio*)**

Abstract

Successful protocols for maturation of oocytes are important, as it is necessary for ensuring successful fertilization, zygote formation, embryo growth and full development. In some species the efficiency of *in vitro* maturation is still very low or is still restricted to a little amount of substances which can be used for the matter. Thus, we studied the use of alternative hormones to the existing protocol for *in vitro* maturation of zebrafish oocytes. The aim of this study was to evaluate the efficiency of the use of carp pituitary extract (CPE), the follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) to oocyte maturation stage III of zebrafish. Oocytes stage III were placed in modified Leibovitz culture medium, supplemented with fetal bovine serum and added to the corresponding hormone treatment (T1-control; T2-16 g / ml of CHE; T3 32 g / ml of CHE, T4 - 48 g / ml of CHE; T5- 64 g / ml of CHE; T6- 80 g / ml of CHE; T7- 0.5 g / ml of FSH, T8 0.5 mg / ml of LH and T9- 0.5 g / ml of FSH and 0.5 mg / ml LH). The maturation rate was assessed by the germinal vesicle break down (GVBD). In all cases there was maturation, though the EHC has demonstrated fairly low maturation rate (T2= 12,8%; T3=24,8%; T4=27%; T5=22,7%; T6=9,7%) and lower in relation of the high efficiency presented by the gonadotropic hormones (T7=16%; T8=35%; T9=50%). In addition it was possible to verify the viability of *in vitro* fertilization in oocyte through the treatment T9 with a result of 68% of hatching and 60% of larvae development rate. The results of maturation in turn using this hormones in stage III oocytes of zebrafish proved promising, and enhance the prospects for improvement and use of this technique for *in vitro* production of viable embryos.

Keywords: fertilization, FSH, LH, ovarian follicles, carp pituitary, gonadotropic hormones.

1.1. Introdução

A maturação é um processo longo durante o qual os oócitos desenvolvem competência para serem fertilizados e então originarem novos indivíduos. A habilidade que esta estrutura tem de ser fertilizada é dependente do estágio de desenvolvimento em que se encontra, visto que os estádios mais primordiais não estão aptos ainda a produzir um novo indivíduo. Ainda assim, a maturação de oócitos não garante a sua capacidade de serem fertilizados e de se desenvolverem em novos indivíduos (Eppig, 1996).

Em teleósteos, como nos vertebrados superiores, a maturação final do oócito ocorre antes da ovulação e consiste na migração e discriminação da vesícula germinal (GVBD), condensação do cromossoma e a formação do primeiro corpo polar (Goetz, 1983). Em peixes o indutor 17 α -20 β -di-hidroxi-4-

pregnen-3-ona (DHP) é eficaz como hormônio de indução da maturação *in vitro* de oócitos com vesícula germinativa completamente formada (estádio III). Apenas um estudo examinou a capacidade dos oócitos maturados serem fertilizados e se desenvolver até a eclosão em zebrafish (Seki et al.2008). Em mamíferos inumeros métodos de maturação *in vitro*, a partir do estágio de surgimento da vesícula germinativa já foram estabelecidos e são utilizados para compreender os mecanismos de regulação da oogenese e da foliculogenese.

Alguns estudos já relataram a utilização do extrato de hipófise de carpa (EHC) na maturação *in vitro* de oócitos (Goetz, 1983; Sorbera, 1999). Os hormônios gonadotrofos atingem a células alvo *in vivo* através de leitos capilar localizados na camada da teca em torno do folículo. No entanto, *in vitro*, elas devem atravessar a superfície do epitélio dos folículos, que pode ser impermeável a elas, sob condições impróprias de cultivo.

Protocolos de sucesso para a maturação de oócitos são importantes, uma vez que é necessário para garantir uma fertilização bem sucedida, formação do zigoto, realização de estágio de blastocisto, crescimento do embrião e do desenvolvimento. Os meios de cultivo desempenham um papel muito importante no desenvolvimento do sistema, uma vez que influenciam diretamente o sucesso da maturação dos oócitos, fertilização e no desenvolvimento dos embriões (Gliedt et al.1996). A composição do meio, pH, osmolaridade e tempo de incubação são cruciais para o sucesso da capacidade de resposta dos oócitos aos hormônios (Patiño & Thomas, 1990). Seki et al. (2008) provaram que a suplementação do meio de cultivo celular com albumina sérica bovina (BSA) foi eficaz na maturação citoplasmática dos oócitos de zebrafish, assim como é em oócitos humanos.

Sabe-se que o hormônio folículo estimulante (FSH) atua na foliculogese precoce e é essencial para um desenvolvimento adequado até à vitelogênese (Kwok et al., 2005). A presença do receptor de FSH em células da granulosa sugere que ele pode promover o desenvolvimento e crescimento folicular (Magalhães et al., 2009). Como as gonadotrofinas de peixes não estão disponíveis, os hormônios a partir de fontes de mamíferos têm sido comumente utilizados como alternativa em vários estudos em peixes (Kwok et al., 2005).

Em medaka, Iwamatsu (1973) relatou que oócitos imaturos tratados com hormônio luteinizante (LH) *in vitro* podem ser maturados, ser fertilizados, eclodir e se desenvolver em peixes adultos. Neste experimento os oócitos imaturos de medaka sofrem maturação citoplasmática, no entanto nenhum juvenil foi obtido. Assim, não está claro se o método utilizado para oócitos na fase de vesicular germinativa suportam maturação citoplasmática após tratamento com LH.

O zebrafish (*Danio rerio*) tornou-se um importante modelo no estudo de genética, biologia do desenvolvimento e biomedicina (Kalueff et al., 2014). Ele tem um papel cada vez mais expressivo na área da pesquisa médica uma vez que o genoma do zebrafish possui semelhanças com o genoma humano (Howe et al., 2013), entre outras vantagens como a facilidade de manejo, menor custo, alta fecundidade, tempo entre gerações rápido e transparência optica durante a embriogenese. Assim, o zebrafish é uma alternativa

promissora como modelo biológico para otimizar os protocolos de maturação *in vitro*.

A partir da contextualização exposta, o objetivo deste estudo foi avaliar diferentes hormônios na indução da maturação *in vitro* do zebrafish e verificar a ocorrência de fertilização e desenvolvimento dos oócitos maturados.

1.2. Materiais e Métodos

Químicos e Hormônios

Exceto quando indicado, os produtos químicos utilizados foram adquiridos da Sigma Aldrich Chemical (St. Louis, MO, EUA). O extrato de hipófise de carpa foi adquirido da Danúbio® Piscicultura.

Animais

Todos os experimentos realizados e os protocolos utilizados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética da instituição (Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Número da autorização: 28099.

As fêmeas utilizadas no experimento foram obtidas inicialmente, a partir do lote de animais em idade reprodutiva mantidos no Laboratório de Aquicultura da UFRGS. Todos os parâmetros para a manutenção de um ambiente ideal para os peixes foram periodicamente verificados, tais como pH, temperatura, alcalinidade, amônia, nitrito e oxigênio dissolvido (Westerfield, 2007). Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia com Tetramin Tropical Fish Flakes (Tetra, Melle, Alemanha), alojados em aquários de 40 litros, com sistema de filtragem da água e aeração, temperatura controlada ($26^{\circ}\text{C} \pm 1,0$), densidade de estoque de 5 peixes/litro (Vargesson, 2007) e fotoperíodo de 14 horas de claro e 10 horas de escuro. A identificação das fêmeas para uso no experimento foi através da observação do abdômen proeminente.

Coleta do ovário e seleção do estágio III

As fêmeas foram anestesiadas por meio de imersão em dose letal (0,6 mg/mL) de triclaína metano sulfonato (Godoy et al., 2013) durante cinco minutos. Foram dissecadas e sua gônada removida cuidadosamente por laparotomia. As gônadas foram colocadas em placa de petri contendo meio Leibovitz modificado 90% (L-15), 20% de soro fetal bovino (SFB) e 100 µg/ml de gentamicina, com pH ajustado para 9,0, osmolaridade média para este meio de 0,29 osm/kg e homogeneizadas, formando um pool de oócitos. Os folículos imaturos do estágio III foram selecionados por tamanho (entre 0,65 e 0,69 mm de diâmetro) e característica visual de ooplasma escuro e víscula germinativa visível. Os oócitos foram isolados manualmente com agulha fina e pipetagem

delicada e, então, colocados em grupos de 10 oócitos por poço (em placas de cultivo de doze poços) para cultivo de acordo com o protocolo de indução a ser utilizado.

Experimento 1 – Determinação do tempo necessário para maturação *in vitro*.

O objetivo do experimento 1 foi determinar o momento para leitura das placas de maturação dos oócitos *in vitro*.

O procedimento de maturação foi baseado no protocolo já estabelecido por Seki (2008). Em uma placa de cultivo celular de doze poços adicionou-se 4 ml de meio Leibovitz L-15 modificado por poço, suplementado com 100 µg/ml de gentamicina e o respectivo indutor. Os tratamentos com EHC utilizados foram: T1 – controle (sem utilização de EHC) e T2; T3; T4; T5 e T6 nas concentrações de 16; 32; 48; 64 e 80 µg/ml de EHC, respectivamente. Para os hormônios gonadotrópicos foi utilizada a dosagem usual para indução *in vitro* em mamíferos: T7=0,5 µg/ml de FSH; T8=0,5 µg/ml de LH, T9=0,5 µg/ml de FSH e 0,5 µg/ml de LH. A placa foi colocada em estufa com temperatura controlada de 27°C e verificada em intervalos de uma hora.

A viabilidade dos oócitos e sua capacidade de maturação foi verificada a cada hora através de estereoscópio em objetiva de 4X. Foi considerado um oócito maturo (estádio V) aquele em que ocorreu o desaparecimento da vesícula germinativa e máxima transparência do oócito (GBVD), já que células não maduras contém vesícula germinativa intacta e permanecem opacos.

Experimento 2 – Avaliação do uso de extrato de hipófise de carpa na maturação *in vitro*.

O objetivo do experimento 2 foi avaliar o desempenho do extrato de hipófise de carpa na maturação de oócitos estágio III de zebrafish.

O procedimento de maturação foi baseado no protocolo já estabelecido e descrito por Seki (2008) no Experimento 1. As concentrações de EHC foram calculadas com base no peso médio da gônada de zebrafish (0,153 gramas) utilizando como menor concentração a dosagem recomendada de 5 a 6 mg de EHC por quilo de fêmea (Harvey & Carolsfeld, 1993), ficando os tratamentos definidos em níveis de inclusão de EHC como no Experimento 1.

O extrato de hipófise de carpa (Danúbio®) foi pesado, macerado, homogeneizado em meio L-15 modificado, imediatamente adicionado aos 4 ml de meio de cultivo do poço da placa de cultura, de acordo com as concentrações fixadas para cada tratamento e incubado em estufa com controle de temperatura a 27°C durante dezoito horas, até o momento da leitura.

A viabilidade dos oócitos e sua capacidade de maturação foi avaliada pelo método da quebra da vesícula germinativa, como no Experimento 1.

Experimento 3 – Avaliação do uso dos hormônios gonadotrópicos na maturação *in vitro*.

O objetivo do experimento 3 foi avaliar o desempenho dos hormônios gonadotrópicos na maturação de oócitos estágio III de zebrafish.

O procedimento de maturação foi baseado no protocolo já estabelecido por Seki (2008), como no experimento 1. As concentrações de hormônio folículo estimulante e luteinizante utilizada foram: T1= controle; T7=0,5 µg/ml de FSH; T8=0,5 µg/ml de LH e T9=0,5 µg/ml de FSH + 0,5 µg/ml de LH, baseada na concentração usual utilizada para maturação em oócitos de mamífero.

A placa foi incubada em estufa com controle de temperatura a 27°C durante vinte horas, até o momento da leitura. A viabilidade dos oócitos e sua capacidade de maturação foi avaliada pelo método da quebra da vesícula germinativa (GVBD) como no experimento 1.

Experimento 4 – Fertilização *in vitro*.

O objetivo do experimento 4 foi avaliar a capacidade dos oócitos maturados nos experimentos anteriores de serem fertilizados e se desenvolverem em novos indivíduos.

Para o processo de fertilização *in vitro* (FIV), os oócitos maturados até o estágio V dos tratamentos que obtiveram melhor sucesso no processo de maturação *in vitro*, tiveram a membrana folicular removida delicadamente com uma agulha de fina espessura sob microscópio ótico (10X) e após transferidos para outra placa com meio de cultivo Leibovitz L-15 modificado. Os machos foram eutanasiados com dose letal de tricáina seguido de decapitação. Os testículos foram removidos por laparotomia, homogeneizados em 10 ml de PBS e imediatamente 100µl desta solução de espermatozoides foi adicionado aos poços da placa de cultivo onde aguardavam os oócitos maturados. Foram incubados a temperatura controlada de 27°C e observados a cada 30 minutos em estereoscópio até a clivagem em duas células (1h) e após acompanhados durante 48 horas.

Análise Estatística

Todos os dados foram submetidos aos testes de Qui-Quadrado e Kruskal-Wallis. Os resultados obtidos com utilização do EHC foram submetidos ao teste de regressão. As análises foram realizadas utilizando-se o procedimento GLM (*General Linear Model*) do programa estatístico SAS, versão 9.0 (2002).

1.3. Resultados

A figura 1 representa o tempo para a taxa de maturação utilizando diferentes concentrações de EHC nos oócitos estágio III por um período de 24

horas (experimento 1). Nenhum oócito maturou antes de 10 horas de incubação. Em 16 horas, nas concentrações de 16 e 32 $\mu\text{g/ml}$, não ocorreu diferença entre os tratamentos testados para a taxa de maturação que foi superior a 35%. Quando ocorreu a leitura em 18 horas, não houve uma clara distinção de superioridades entre as diferentes concentrações de EHC. A partir desse tempo os oócitos iniciaram um processo de degeneração celular, ocorrendo deformidade na membrana externa, rompimento e extravazamento de conteúdo celular, o que resultou em percentuais cada vez menores de taxa de maturação.

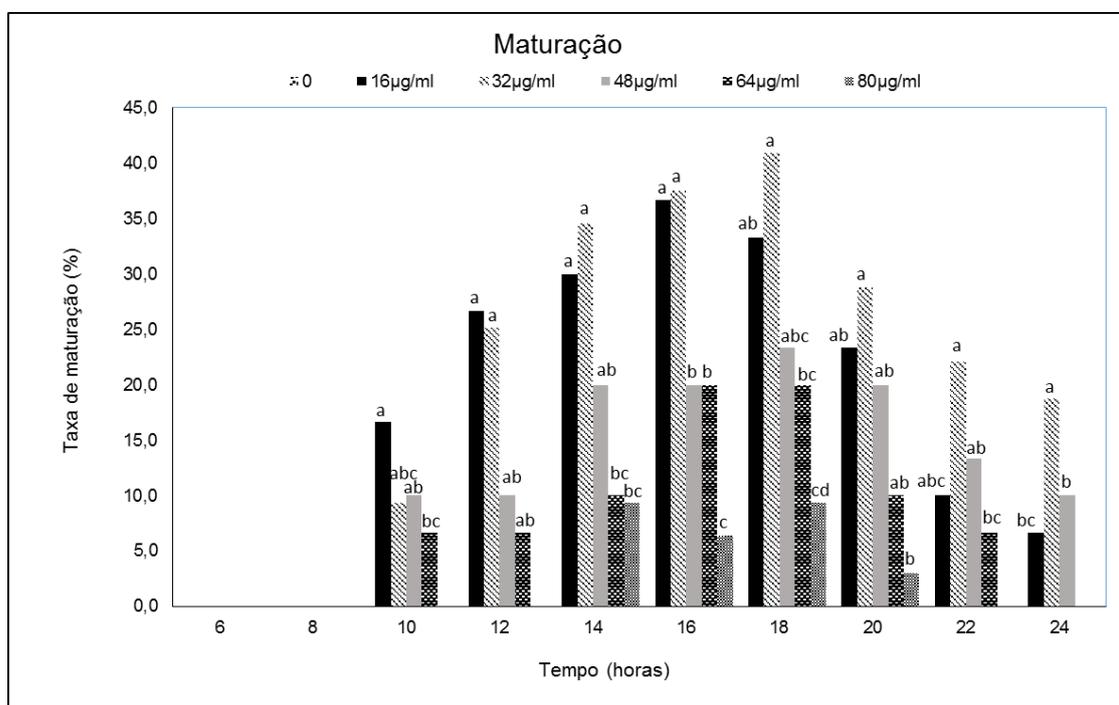


Figura 1. Taxa de maturação dos oócitos submetidos a maturação com extrato de hipófise de carpa incubados por um período de 24 horas, em temperatura controlada de 27°C. Letras distintas diferem-se estatisticamente, $p < 0,001$, em um mesmo intervalo de tempo.

Todas as concentrações utilizadas de extrato de hipófise de carpa demonstraram capacidade de maturação (Figura 2). A média da taxa de maturação para cada tratamento foi: T1=0%; T2=12,8%; T3=24,8%; T4=27%; T5=22,7%; T6=9,6%, onde pelo cálculo de regressão foi determinada a concentração ideal de inclusão para o EHC de 47 $\mu\text{g/ml}$.

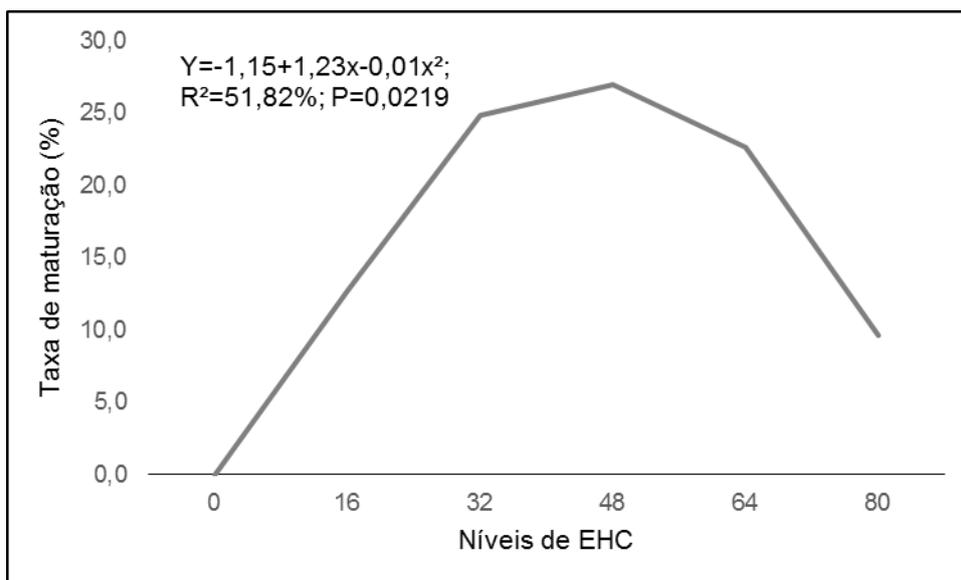


Figura 2. Curva de regressão da taxa de maturação *in vitro* dos oócitos de zebrafish utilizando extrato de hipófise de carpa.

Na Figura 3 está representada a taxa de maturação dos oócitos em estágio III utilizando os hormônios LH e FSH por um período de 24 horas. Nenhuma célula se desenvolveu em até 8 horas de incubação. A partir desse tempo houve aumento na taxa de maturação até 20 horas a qual reduziu-se levemente até o final do tempo de maturação, definido em 24 horas.

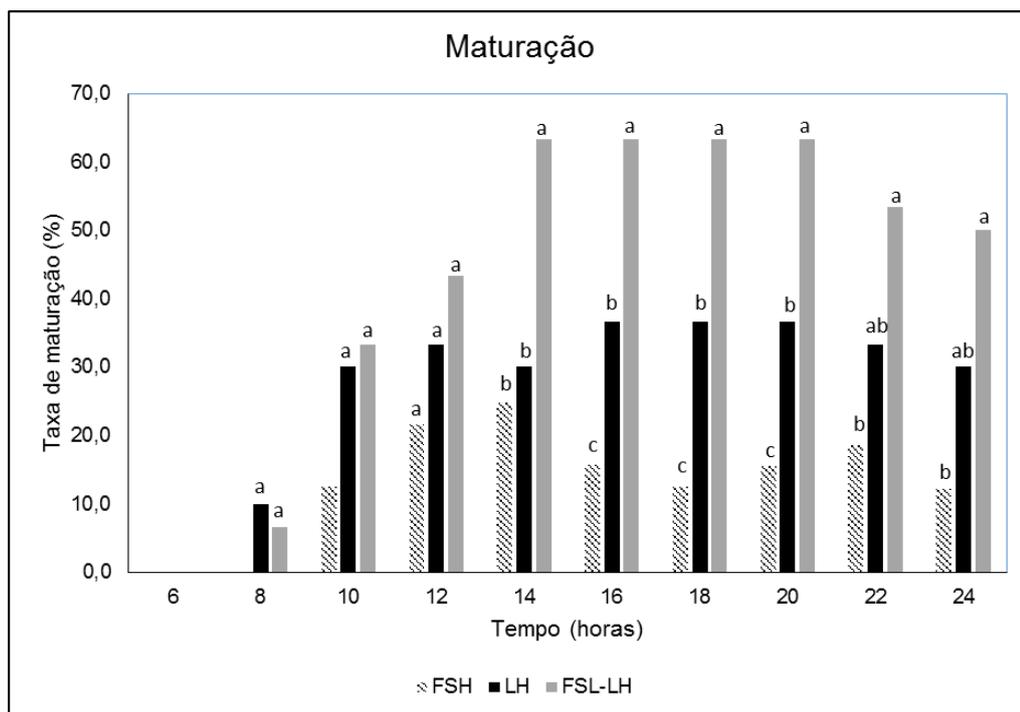


Figura 3. Taxa de maturação dos oócitos tratados com diferentes hormônios, LH, FSH e FSH+LH incubados por um período de 24 horas com temperatura controlada de 27°C. Letras distintas diferem-se estatisticamente, $p < 0,001$, no mesmo intervalo de tempo.

Os hormônios LH e FSH originados de mamíferos também possibilitaram capacidade de maturação (experimento 3). Em ordem crescente da pior para a melhor média da taxa de maturação obtida FSH (T7=16%); LH (T8=35%) e FSH + LH (T9=50%).

Em relação a fertilização *in vitro*, os oócitos maturados com EHC não resultaram em fertilização. Os oócitos submetidos à maturação com este indutor hormonal ficaram sensíveis e se rompiam com facilidade durante a manipulação, tornando-se inviável a continuação do processo. Já os oócitos do tratamento 9 (FSH+LH) apresentaram capacidade de fertilização. Estes oócitos apresentaram-se mais uniformes e resistentes durante a retirada da membrana folicular. Neste caso, em 68% dos oócitos maturados houve clivagem em duas células (entre quarenta minutos e uma hora) e destes 60% eclodiram em larvas (entre quarenta e oito e cinquenta e duas horas).

1.4. Discussão

O processo de maturação foi avaliado morfológicamente por inspeção visual de tamanho, coloração e transparência, através visualização da quebra da vesícula germinativa (Germinal Vesicle Break Down ou GBVD), do mesmo método utilizado com eficácia na identificação da maturação oocitária em salmão (Souer, 2011; Young, 2005), linguado (Picha, 2012), tainha (Das,

2014), carpa (Nayak et al., 2001) e zebrafish (Seki, 2008). Deste modo, foi possível observar que os oócitos estágio III de zebrafish maturam quando utilizaram-se quaisquer dos hormônios indutores testados: ECH, FSH e LH, assim como no protocolo pré estabelecido por Seki (2008) que utilizou o 17 α , 20 β dihidroxi-4-pregnen-3-one (DHP).

Quanto ao tempo necessário para maturação, houve variação nos tempos de leitura para maturação de oócitos estágio III em zebrafish, variando de 14 horas nos hormônios gonadotrópicos FSH e LH, até 18 horas com EHC. O período necessário para a ação dos hormônios testados neste estudo foi mais longo quando comparados com o relato de Seki (2008), um pouco mais que 4 horas (270 minutos), utilizando DHP. Cabe ressaltar que o hormônio reprodutivo DHP é específico da fase de maturação em peixes, logo espera-se uma ação mais rápida na maturação oocitária. Por outro lado, quando comparamos com outros hormônios indutores, o estudo de Das (2014) utilizou na tainha (*Mugil cephalus*): estradiol, progesterona, gonadotropina coriônica humana (hCG) e LH, e o tempo foi de 15 horas para ocorrer maturação. Para carpa (*Catla catla*) e catfish (*Heteropneustes fossilis*), utilizando triiodotironina (T3) associado a outros hormônios e esteroides sexuais como indutor, o tempo de maturação utilizado foi de 24 horas (Nayak et al., 2001). Assim, o intervalo de ação dos hormônios testados neste estudo com o zebrafish foram semelhantes aos intervalos de tempo dos demais estudos encontrados na literatura.

A proposição de testar o ECH estava em sua simplicidade na utilização, pois não necessita de instalações (refrigeração) ou equipamentos e sua dosagem é facilmente calculada a partir do peso da gônada de cada espécie. Todavia, uma dificuldade na utilização do ECH reside no fato de em um mesmo lote haver diferença grande entre as amostras de hipófise provenientes de diferentes doadores, sendo muito difícil obter duas hipófises com a mesma concentração de hormônio. De todo modo, foi possível constatar no presente estudo que a concentração de hipófise para maturação foi dose dependente. De acordo com o cálculo de regressão, a concentração de 47 $\mu\text{g/ml}$ foi o valor em que se obteve a melhor taxa de maturação, logo abaixo e acima desta concentração não ocorreu significativo ganho na maturação. A concentração de 48 $\mu\text{g/ml}$, em que foi verificada a taxa de maturação mais elevada (27%) no presente estudo, foi inferior a encontrada por Sorbera (1999), que utilizou extrato de hipófise para fazer maturação *in vitro*, resultando em uma taxa de maturação de 89% em robalo (*Dicentrarchus labrax*). Cabe ressaltar que no estudo de Sorbera (1999) a concentração de EHC também apresentou dependência na concentração utilizada para indução *in vitro* da maturação.

A interdependência de cada etapa na sequência de maturação *in vitro* é uma das dificuldades encontradas para aprimoramento dessa tecnologia. Utilizando um meio de maturação adequado e um protocolo ajustado foi possível maturar os oócitos utilizando tanto os indutores gonadotrópicos LH e FSH, quanto o EHC. Suplementou-se o meio de cultivo com soro fetal bovino (SFB), já que tem sido relatado que a adição do mesmo,

ao meio de cultivo, aumenta a taxa de crescimento folicular em peixes (Goswami et al., 2010; Anil et al., 2011). Os hormônios LH e FSH provenientes, obtiveram o melhor desempenho assim como relatado por Pang e Ge (2002) que utilizaram hCG (fonte mamífera) como indutor hormonal na maturação dos oócitos no estágio III de zebrafish. No entanto, as taxas de maturação com maior eficácia encontradas neste estudo (EHC = 27% e FSH+LH=50%) ainda foram inferiores as taxas de maturação ao redor de 85% encontradas por Seki (2008), utilizando o DHP.

Assim como em mamíferos, a maturação nuclear dos oócitos de peixe não garante sua habilidade de ser fertilizado e de eclodir, pois a maturação citoplasmática é essencial neste processo. Para determinar a habilidade de maturação é necessário examinar as taxas de fertilização e eclosão. Para fertilização *in vitro*, foram escolhidos os tratamentos que obtiveram os melhores resultados na maturação com EHC (T4) (taxa de maturação de 27%) e FSH associado ao LH (T9) que maturou 50% dos oócitos. Não foi possível obter novos indivíduos com uso do EHC, pois eles apresentaram-se muito frágeis após o processo. No tratamento com FSH associado ao LH foi possível observar novos exemplares, resultando em uma taxa de fertilização de 68% e de eclosão de 60%, semelhante à taxa relatada para zebrafish por Seki (2008) de 64 e 60% respectivamente.

A eficiência dos processos *in vitro* para maturação de uma das concentrações de EHC (T4) e de maturação e fertilização com o FSH e LH e neste trabalho demonstrarem ser eficazes, seu uso pode ser aplicado em outros teleósteos. O protocolo desenvolvido também pode se tornar uma ferramenta para o entendimento do mecanismo de regulação da oogenese e fliculogenese em zebrafish. Estudos futuros podem ser feitos no âmbito de aprimorar a técnica utilizada, melhorar as taxas de maturação e aperfeiçoar os métodos alternativos para obtenção de novos indivíduos.

1.5. Conclusão

O uso de extrato de hipófise de carpa e dos hormônios folículo estimulante e luteinizante resultou em maturação dos oócitos estágio III de zebrafish. O LH e o FSH tiveram um melhor desempenho, apresentando taxas de maturação superiores, sendo ainda possível verificar a ocorrência de fertilização dos oócitos e eclosão em larva no tratamento com uso simultâneo de FSH e LH.

Agradecimentos

Agradecemos o Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução, por ceder a estrutura e os equipamentos para realização do experimento e a Capes pela concessão da bolsa.

Referências

- ANIL, S.; ZAMPOLLA, T.; ZHANG, T. Development of in vitro culture method for zebrafish ovarian tissue fragment. **Cryobiology**, Rockville, v.63, n.3, p.311-312, 2011.
- DAS, P. et al. In vitro induction of oocyte maturation and steroidogenesis by gonadotropins, insulin, calcitonin and growth factor in an estuarine flat head grey mullet, *Mugil cephalus* L. **Fish Physiology and Biochemistry**, Calcutta, v. 40, p. 105-116, 2014.
- EPPIG, J. J.; O'BRIAN M. J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biology of Reproduction**, Maine, v.54, p.197-207, 1996.
- GLIEDT, D. W. et al. Effect of media, serum, oviductal cells and hormones during maturation on bovine embryo development in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, p. 536-542, 1996.
- GODOY, L. C. et al. A study on the vitrification of stage III zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. **Cryobiology**, San Diego, v.67, n.3, p.347-354, 2013.
- GOETZ, F. W.; Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. **Fish Physiology**, Notre Dame, v. 9, p. 117- 170, 1983.
- GOSWAMI, M. et al. Development of cell culture system from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Molecular Biology Reports**, India v. 37, p. 2043-2048, 2010.
- HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. Induced breeding in tropical fish culture. **International Development Research Center**, Ottawa, p.144, 1993.
- IWAMATSU, T. On the mechanism of ooplasmic segregation upon fertilization in *Oryzias latipes*. **Japanese Journal of Ichthyology**, Japão, v. 20, p. 73–78, 1973.
- HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, London, v.496, n.7446, p.498–503, 2013.
- KALUEFF, A. V. et al. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorder. **Trend in Pharmacological Sciences**, v.35, n.2, p. 63-75, 2014.
- KWOK, H. K. et al. Zebrafish gonadotropins and their receptors: Cloning and characterization of zebrafish follicle stimulating hormone and luteinizing hormone receptors-evidence for their distinct functions in follicle development. **Biology Reproduction**, Hong Kong, v. 72, p. 1370-1381, 2005.

MAGALHÃES, D. M. et al. Impact of pituitary FSH purification on in vitro early folliculogenesis in goats. **Biocell**, Mendoza, v. 33, p. 91–97, 2009.

NAYAK, P. K. et al. Relative in vitro effectiveness of various steroid hormones on oocyte maturation in catfish *Heteropneustes fossilis*. **Indian Journal of Fisheries**, India, v. 48, p. 77-84, 2001.

PANG, Y., GE, W. Gonadotropin and activin enhance maturational competence of oocytes in the zebrafish (*Danio rerio*). **Biology of Reproduction**, Maine, v. 66, p. 259-265, 2002.

PATIÑO, R.; THOMAS, P. Induction of maturation of Atlantic croaker oocytes by $17\alpha,20\beta,21$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one in vitro: consideration of some biological and experimental variables. **Journal of Experimental Zoology**, Lahore, v. 255, p. 97–109, 1990.

PICHA, M. E.; SHI, B.; THOMAS, P. Dual role of IGF-II in oocyte maturation in southern flounder *paralichthys lethostigma*: up-regulation of MPRA and resumption of meiosis. **General and Comparative Endocrinology**, Texas, v. 177, p. 220-230, 2012.

SEKI, S. et al. Development of a reliable in vitro maturation system for zebrafish oocytes. **Reproduction research**. Reproduction, Nottingham, v. 135, p. 285–292, 2008.

SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Cellular aspects of oocyte growth in Teleosts. **Zoological Science**, Tokyo, v.6, p.211-231, 1989.

SELMAN, K. et al. Stage of oocyte development in the Zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Journal of Morphology**, Philadelphia, v. 218, p. 203-224, 1993.

SORBERA, L. A. et al. In vitro oocytes maturation in the sea bass: effects of hCG, pituitary and steroids. **Journal of Fish Biology**, London, v. 55, p. 9-25, 1999.

SOUER, A.; SCHRECK, C. B. In vitro induction of final maturation of oocytes from Coho salmon. **Transactions of the American Fisheries Society**, USA, v. 111, p.3, 1982.

YOUNG, G., KAWAGAMA, H., NAGAYAMA, Y. Oocyte maturation in the Amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*): in vitro effect of salmon gonadotropin, steroids and cyanoketone (an inhibitor of 3β -hydroxy- Δ^5 -steroid dehydrogenase). **Journal of Experimental Zoology**, Lahore, v. 224, p. 265-275, 1982.

WESTERFIELD, M. **The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*)**. Eugene: University of Oregon Press, 2000.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

O uso de extrato de hipófise de carpa e dos hormônios folículo estimulante e luteinizante resultou em maturação dos oócitos estágio III de zebrafish. Os tratamentos em que foram utilizados hormônios gonadotrópicos resultaram em melhores taxas de maturação quando comparados com EHC.

A utilização do extrato de hipófise de carpa tem capacidade de maturação dos oócitos até a fase em que estão maduros para serem liberado no ambiente (estádio V), no entanto ainda não foi possível fazer a fertilização *in vitro* dos oócito maturados por este protocolo.

A utilização conjunta dos hormônios gonadotrópicos FSH e LH tem capacidade de maturar oócitos estágio III de zebrafish *in vitro*, capacitando-os para serem fertilizados e dar origem a novos indivíduos.

2. PERSPECTIVAS

A técnica desenvolvida nesse trabalho foi promissora para maturação oocitária em zebrafish. No entanto, a metodologia para utilização do EHC ainda precisa ser aprimorada e melhor desenvolvida para que os oócitos tenham capacidade de serem fertilizados. A hipófise de carpa já está bem consolidada como indutor hormonal *in vivo* mais utilizado, e devido a suas vantagens de armazenamento, acessibilidade e custo, pode se tornar uma excelente ferramenta para produção *in vitro* de novos indivíduos.

O meio de cultivo tem um papel importante no desenvolvimento no sistema de cultivo *in vitro*, uma vez que pode influenciar o sucesso da maturação dos oócitos, fertilização, no desenvolvimento e eclosão das larvas. Em zebrafish a eficiência do desenvolvimento oocitário *in vitro* ainda é muito baixo, assim, pesquisadores têm buscando novas combinações de suplementos para melhorar os meios de maturação e cultivo *in vitro* (Seki et al. 2008; Tsai et al., 2010; Anil et al., 2011). As gonadotrofinas de peixes não estão facilmente disponíveis para uso, assim, hormônios a partir de fontes de mamíferos têm sido utilizados como alternativa em estudos em peixes (Kwok et al., 2005). Após o cultivo *in vitro* utilizando EHC observamos em nossos resultados uma baixa taxa de maturação e inviabilidade dos oócitos maturados de serem fertilizados. É provável que não tenha ocorrido a adequada maturação citoplasmática, impossibilitando a obtenção de novos indivíduos. Logo, o meio de cultivo *in vitro* deve garantir todo o aporte nutricional e hormonal necessários para o desenvolvimento celular correto dos oócitos, matando-os viáveis até a fertilização e eclosão.

Os dados de maturação e fertilização *in vitro* utilizando oócitos estágio III de zebrafish induzidos hormonalmente com extrato de hipófise de carpa e com os hormônios luteinizante e foliculoestimulante mostraram-se promissores, e reforçam as perspectivas para o uso desta técnica para produção *in vitro* de novos indivíduos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL Jr., H. Utilização do extrato hipofisário de galinha *Gallus domesticus*, para indução a desova de Tenca Tinca tinca. Opção de banco de hipófise para o pequeno produtor rural. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 3., 1995, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre, 1995. p. 154-161
- BAI, C. et al. Cooling rate optimization for zebrafish sperm cryopreservation using a cryomicroscope coupled with SYBR14/PI dual staining. **Cryobiology**, San Diego, v.67, n.2, p.117-123, 2013.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2002.
- BERNARDINO, G. Propagação artificial do matrinchã, *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae). **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 6, p. 1-9, 1993.
- BRACKETT, B. G.; MILLS, J. A.; JEITLES, G. G. Jr. In vitro fertilization of rabbit ova recovered from ovarian follicles. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 23, p. 898–909, 1972.
- ÇAKICI, O.; ÜÇÜNCÜ, S. I. Oocyte Development in the Zebrafish, *Danio rerio* (Teleostei: Cyprinidae). **Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Faisalabad, v.24, n.1-2, p.137–141, 2007.
- CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n. 3 p.361-366, 2007.
- CONNOLLY, M. H. et al. Temporal dynamics of oocyte growth and vitellogenin gene expression in zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, Larchmont, v.11, n.2, p.107-114, 2014.
- CROSS, P. C.; BRINSTER, R. L. In vitro development of mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, Maine, v. 3, p. 298–307, 1970.
- DETRICH, W. H., WESTERFIELD. The zebrafish: biology. **Methods in cell biology**, San Diego, CA, v. 59, 1999.
- DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetics, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, Amsterdam, v.208, n.3-4, p.191-367, 2002.

DRAPER, B. W.; MCCALLUM, C. M.; MOENS, C. B. Nanos1 is required to maintain oocyte production in adult zebrafish. **Developmental biology**, New York, v.305, n.2, p.589-598, 2007.

de VLAMING, V. L. Oocyte development patterns and hormonal involvements among teleost. Control Process in Fish Physiology. **Croom Helm**, London, England, p. 176-199, 1983.

FAUVEL, C. et al. Reliable assessment of overripening in turbot (*Scophthalmus maximus*) by a simple pH measurement. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 117, p. 107–113, 1993.

FRAZER, C. A.; HALL, M.R. Studies on primary cell cultures derived from ovarian tissue of *Penaeus monodon*. **Methods in cell science**, India, v. 21, n. 4, p.213-218, 1999.

GLIEDT, D. W. et al. Effect of media, serum, oviductal cells and hormones during maturation on bovine embryo development in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, p. 536-542, 1996.

GOBELLO, C. Temas de reproducción de caninos y felinos por autores latinoamericanos. **Intervet Argentina S.A.**, 1a edição, Buenos Aires, Argentina, p. 107-115, 2004.

GOETZ, F. W.; Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. **Fish Physiology**, Notre Dame, v. 9, p. 117- 170, 1983.

GOLDSMITH, P.; SOLARI, R. The role of zebrafish in drug discovery. **Drug Discovery World Spring**, p. 74-78, 2003.

GOSWAMI, M. et al. Development of cell culture system from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Molecular Biology Reports**, India v. 37, p. 2043-2048, 2010.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. Induced breeding in tropical fish culture. **International Development Research Center**, Ottawa, p.144, 1993.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, London, v.496, n.7446, p.498–503, 2013.

IRITANI, A.; NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal of Reproduction and Fertility**, Japão, v. 50, p. 119–121, 1977.

IRITANI, A.; NIWA, K., IMAI, H. Sperm penetration in vitro of pig follicular oocytes matured in culture. **Journal of Reproduction and Fertility**, Japão, v.54, p. 379–383, 1978.

IWAMATSU, T. et al. Induction and inhibition of in-vitro oocyte maturation and production of steroids in fish follicles by forskolin. **Journal of Experimental Zoology**, Japão, v. 241, p. 101-111, 1987.

IWAMATSU, T.; CHANG, M. C. Sperm penetration in vitro of mouse oocytes at various times during maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**, Japão, v.31, p.237–247, 1972.

IWAMATSU, T. On the mechanism of ooplasmic segregation upon fertilization in *Oryzias latipes*. **Japanese Journal of Ichthyology**, Japão, v. 20, p. 73–78, 1973.

JALABERT, B.; In-vitro oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), northern pika (*Essox lucius*) and goldfish (*Carassius auratus*). **Journal of Fisheries Research Board of Canada**, Canadá, v. 33, p. 974-988, 1976.

KALUEFF, A. V. et al. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorder. *Trend in Pharmacological Sciences*, v.35, n.2, p. 63-75, 2014.

KOÇ, N. D.; AKBULUT, C. Electron and Light Microscopic Investigations of Follicular Epithelium in Vitellogenic Oocyte of Zebrafish (*Danio rerio*). **Pakistan Journal of Zoology**, Lahore, v.44, n.6, p.1581-1586, 2012.

KUMAR, G. S., SINGH, I. S. B., PHILIP, R. Development of a cell culture system from the ovarian tissue of African catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 194, p.51-62, 2001.

KWOK, H. K. et al. Zebrafish gonadotropins and their receptors: Cloning and characterization of zebrafish follicle stimulating hormone and luteinizing hormone receptors-evidence for their distinct functions in follicle development. **Biology Reproduction**, Hong Kong, v. 72, p. 1370-1381, 2005.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. **Aquaculture**, New York, v. 269, n. 1-4, p.1-20, 2007.

LESSMAN, C. A. Oocyte maturation: Converting the zebrafish oocyte to the fertilizable egg. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v.161, n.1, p.53–57, 2009.

LI, S. et al. In vitro oocytes maturation in the zebrafish and the fertilization and development of the mature egg. **Chinese Journal of Biology**, China, v. 19, p. 247-255, 1993.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews**, London, v.8, n.5, p.353-367, 2007.

LAHNSTEINER, F., WEISMANN, T., PATZNER, R. A. Composition of the ovarian fluid in 4 salmonid species: *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta flacustris*, *Salvelinus alpinus* and *Hucho hucho*. **Reproduction, Nutrition, Development**, Austria, v. 35, p. 465–474, 1995.

LUBZENS, E. et al. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. **General and comparative endocrinology**, New York, v.165, n.3, p.367-389, 2010.

MAGALHÃES, D. M. et al. Impact of pituitary FSH purification on in vitro early folliculogenesis in goats. **Biocell**, Mendoza, v. 33, p. 91–97, 2009.

MENKE, A. L. et al. Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. **Toxicologic Pathology**, Oregon, v.39, n.5, p.759-775, 2011.

MUKHERJEE, A. B., Normal progeny from fertilization in vitro of mouse oocytes matured in culture and spermatozoa capacitated in vitro. **Nature**, London, v. 237, p. 397–398, 1972.

NAGAHAMA, Y.; KAGAWA, H.; TASHIRO, F. The in vitro effects of various gonadotropins and steroid hormones on oocyte maturation in amago salmon and rainbow trout. **The Japanese Society of Fisheries Science**, Japão, v. 46, p. 1097-1102, 1980;

NAKAMURA, S. et al. Ovarian germline stem cells in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). **International journal of biological sciences**, Lake Haven, v.7, n.4, p.403–409, 2011.

NIWA, K., CHANG, M. C. Fertilization of rat eggs in vitro at various times before and after ovulation with special reference to fertilization of ovarian oocytes matured in culture. **Journal of Reproduction and Fertility**, Japão, v. 43, p. 435–451, 1975.

NIWA, K. et al. Fertilization of rat oocytes cultured in vitro from various stages of maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**, Japão, v. 47, p. 105–106, 1976.

PATIÑO, R.; THOMAS, P. Induction of maturation of Atlantic croaker oocytes by $17\alpha,20\beta,21$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one in vitro: consideration of some

biological and experimental variables. **Journal of Experimental Zoology**, Lahore, v. 255, p. 97–109, 1990.

PILLAY, T. V. R. Aquaculture: Principle and Practices. **Fishing Book News**, London, p. 575, 1990.

SEKI, S. et al. Development of a reliable in vitro maturation system for zebrafish oocytes. **Reproduction research**. Reproduction, Nottingham, v. 135, p. 285–292, 2008.

SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Cellular aspects of oocyte growth in Teleosts. **Zoological Science**, Tokyo, v.6, p.211-231, 1989.

SELMAN, K. et al. Stage of oocyte development in the Zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Journal of Morphology**, Philadelphia, v. 218, p. 203-224, 1993.

SORBERA, L. A. et al. In vitro oocytes maturation in the sea bass: effects of hCG, pituitary and steroids. **Journal of Fish Biology**, London, v. 55, p. 9-25, 1999.

SOUZA, E. D. et al. Extratos de hipófise de frango e coelho na indução reprodutiva da carpa comum (*Cyprinus carpio*). **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 25, p. 99-107, 2003.

SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 83, p. 13-34, 2008.

SQUIRE, J. M.; KNUPP, C.; LUTHER, P. K. Zebrafish - topical, transparent, and tractable for ultrastructural studies. **Journal of General Physiology**, New York, v. 131, n. 5, p. 439-443, 2008.

STREIT Jr., D. P. et al. Estudo comparativo da indução hormonal da espermição em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de frango, coelho e carpa. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 25, p. 261-266, 2003.

VARGESSON, N. A. '**Zebrafish**' in **Manual of Animal Technology**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2007.

WESTERFIELD, M. **The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*)**. Eugene: University of Oregon Press, 2000.

WHITTINGHAM, D. G.; BAVISTER, B. D. Development of hamster eggs fertilized in vitro or in vivo. **Journal of Reproduction and Fertility**, Japão, v. 38, p. 489–492, 1974.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**: manual de extensão. Brasília, 1983.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P. O. Reprodução de peixes migradores de água doce. In: TÓPICOS especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo, 2004. p. 45-74.