

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM
GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA**

**INFLUÊNCIA DO ACESSO AOS PRÓPRIOS OVOS NO
ÍNDICE DE MASSA CORPORAL, NO PERFIL LIPÍDICO
SÉRICO E NA PRESENÇA DE GORDURA NOS
HEPATÓCITOS DE *Danio rerio***

GABRIELA LIMA PEDROSO

PORTO ALEGRE,

2011

Gabriela Lima Pedroso

**INFLUÊNCIA DO ACESSO AOS PRÓPRIOS OVOS NO
ÍNDICE DE MASSA CORPORAL, NO PERFIL LIPÍDICO
SÉRICO E NA PRESENÇA DE GORDURA NOS
HEPATÓCITOS DE *Danio rerio***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia E Hepatologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia.

Orientadora: Profa. Themis Reverbel da Silveira

PORTO ALEGRE,

2011

CIP - Catalogação na Publicação

Lima Pedroso, Gabriela
INFLUÊNCIA DO ACESSO AOS PRÓPRIOS OVOS NO ÍNDICE
DE MASSA CORPORAL, NO PERFIL LIPÍDICO SÉRICO E NA
PRESENÇA DE GORDURA NOS HEPATÓCITOS DE *Danio rerio* /
Gabriela Lima Pedroso. -- 2011.
90 f.

Orientadora: Themis Reverbel da Silveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia,
Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Zebrafish. 2. Sangue de Zebrafish. 3. Perfil
lipídico de Zebrafish. 4. Ingestão dos ovos. I.
Reverbel da Silveira, Themis, orient. II. Título.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à professora Themis Reverbel da Silveira a oportunidade que me deu de realizar este estudo mesmo me conhecendo tão pouco. Agradeço o privilégio e a honra da convivência, o apoio quando eu trouxe problemas, muitos problemas. Agradeço todas as palavras de sabedoria e a acolhida, que fez com que eu e todos os seus alunos nos sentíssemos como membros de uma família.

Agradeço à Thais Ortiz Hammes primeiramente a ajuda em convencer a professora Themis a me dar a oportunidade de juntar-me ao grupo de pesquisa, também a grande amizade, as inúmeras risadas e toda a IMENSA ajuda.

Agradeço aos colegas e amigos Laura Alencastro, Álvaro Laureano e Rafael Maurer a convivência, não só científica. A todos os alunos de iniciação científica, em especial Laisa Beduschi “Califa” que acompanhou esse estudo mais de perto, agradeço toda a ajuda, a atenção aos experimentos e a convivência sempre agradável.

A todos os membros do Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental, e a Profa. Úrsula Matte agradeço o apoio científico e o aprimoramento das discussões de trabalho.

Agradeço à Joiza Lins Camargo, chefe da unidade de bioquímica do serviço de patologia do HCPA, a ajuda no desenvolvimento das técnicas de análises bioquímicas e a Dra. Carolina Hartmann o auxílio com as análises histológicas.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre agradeço a estrutura oferecida no Centro de Pesquisa Experimental e a cordialidade e competência de seus funcionários. Aos financiadores FINEP e CAPES agradeço o suporte fundamental para a realização deste estudo.

Por fim, agradeço à minha família, em especial aos meus pais, o apoio, aos amigos, a torcida e ao Gustavo, o companheirismo.

Enfim, deixo meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste projeto.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.2 Aspectos anatômicos e fisiológicos do Zebrafish.....	17
2.2.1 Sistema Digestório.....	17
2.2.2 Sistema Hematológico	22
2.2.3 Sistema Urinário	22
2.2.4 Sistema Vascular.....	22
2.2.5 Sistema Respiratório.....	23
2.3 Características dos ovos de Zebrafish	23
2.4 Acúmulo de lipídeos nos ovos de Zebrafish.....	25
2.5 Metabolismo dos lipídeos no Zebrafish.....	26
2.6 Análise bioquímica do sangue de Zebrafish.....	33
3 JUSTIFICATIVA.....	36
4 HIPÓTESE	37
5 OBJETIVOS	38
5.1 Objetivo Geral	38
5.2 Objetivos Específicos.....	38
6 MATERIAIS E MÉTODOS	39
6.1 Local	39
6.2 Animais e aquários.....	39
6.3 Tamanho da amostra	40
6.4 Desenho experimental	40
6.5 Alimentação	41

6.6	Peso e comprimento dos peixes e cálculo do IMC.....	42
6.7	Coleta e processamento do sangue.....	43
6.8	Padronização e utilização dos kits Colorimétricos	44
6.9	Análise histológica	52
6.10	Análise estatística	53
6.11	Aspectos Éticos.....	54
7	RESULTADOS.....	55
7.1	Índice de massa corporal	55
7.2	Padronização dos kits colorimétricos	56
7.3	Níveis séricos de Colesterol total	57
7.4	Níveis séricos de HDL – colesterol	58
7.5	Níveis séricos de LDL – colesterol	58
7.6	Níveis séricos de triglicérides.....	59
7.7	Análise histológica	60
8	DISCUSSÃO.....	61
8.1	Coleta de sangue	61
8.2	Anestesia	63
8.3	Utilização do IMC	64
8.4	Redução da escala dos teste colorimétricos	65
8.5	Níveis de lipídeos séricos.....	65
8.6	Análise histológica	67
8.7	Considerações finais	68
9	CONCLUSÕES.....	71
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
11	ANEXOS	77

Lista de Ilustrações

Figura 1: Representação gráfica da estrutura hepática de mamíferos e do Zebrafish	Página 20
Figura 2: Descrição esquemática dos estágios de desenvolvimento do ovócito de peixes teleósteos.	Página 24
Figura 3: Anatomia da larva de Zebrafish e detecção de mutações na homeostase dos lipídeos.	Página 27
Figura 4: Maquinário de vertebrados para o transporte intestinal e hepático de lipídeos.	Página 31
Figura 5: Localização anatômica e nomenclatura das nadadeiras do Zebrafish	Página 44
Figura 6: Cálculo do valor de colesterol total a partir da absorbância das amostras.	Página 47
Figura 7: Cálculo do valor de HDL - colesterol a partir da absorbância das amostras.	Página 49
Figura 8: Cálculo do valor de LDL - colesterol a partir da absorbância das amostras.	Página 50
Figura 9: Cálculo do valor de HDL - colesterol a partir da absorbância das amostras	Página 52
Figura 10: Etapas para retirada do tecido hepático.	Página 53
Figura 11: IMC dos peixes antes e duas semanas após o experimento.	Página 56
Figura 12: Níveis séricos de colesterol total dos grupos com acesso aos ovos e sem acesso aos ovos.	Página 57
Figura 13: Níveis séricos de HDL - colesterol dos grupos com acesso aos ovos e sem acesso aos ovos.	Página 58
Figura 14: Níveis séricos de LDL – colesterol dos grupos com acesso aos ovos e sem acesso aos ovos.	Página 59
Figura 15: Níveis séricos de triglicérides dos grupos com acesso aos ovos e sem acesso aos ovos.	Página 60
Figura 16: Aspectos microscópicos dos cortes de fígado dos dois grupos. Coloração com hematoxilina e eosina (400x).	Página 61

Lista de tabelas

Tabela 1: Relação de modelos de doenças metabólicas e nutricionais humanas que utilizam Zebrafish como animal experimental.	Página 16
Tabela 2: Síntese das diferenças entre o fígado de peixes, roedores e humanos.	Página 21
Tabela 3: Energia fornecida por cada nutriente da ração dos peixes.	Página 42
Tabela 4: Valores de colesterol e triglicérides dos soros sintéticos.	Página 45
Tabela 5: Amostras utilizadas para análise de colesterol total e volumes indicados pelo fabricante.	Página 47
Tabela 6: Amostras utilizadas para análise de HDL - colesterol e quantidades indicadas pelo fabricante.	Página 49
Tabela 7: Amostras utilizadas para análise de triglicérides e quantidades indicadas pelo fabricante.	Página 51
Tabela 8: Redução de escala padronizada para os testes colorimétricos.	Página 57

Lista de abreviaturas

ENU: n-Etil-n-Nitrosurea

O₂: Oxigênio molecular

CO₂: Dióxido de carbono

DNA: Ácido desoxiribonucléico

RNA: Ácido Ribonucléico

rRNA: RNA ribossomal

tRNA: RNA transportador

mRNA: RNA mensageiro

VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade

YSL: Yolk syncytial layer

TAG: Triacilglicerol

MTP: microsomal triglyceride transfer protein

AcSCoA: acetil coenzima A sintase

Pdi: proteína dissulfeto isomerase

ApoB: apolipoproteína B

SREBP: *sterol regulatory element binding protein*

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

HDL: Lipoproteína de alta densidade

ALP: Fosfatase alcalina

ALT: Alanina aminotransferase

BUN: Nitrogênio uréico sanguíneo

IMC: Índice de massa corporal

SPSS: *Statistical Package for Social Sciences*

MS-222: metano sulfonato de tricaína

OBELIX: *OBesogenic Endocrine disrupting chemicals: Linking prenatal eXposure to the development of obesity later in life*

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

Resumo

Introdução: Os ovos de Zebrafish que não são fertilizados podem ser uma fonte de alimento para o peixe. O objetivo deste estudo é avaliar a influência do acesso aos ovos de Zebrafish no Índice de Massa Corporal, níveis séricos de colesterol e triglicérides e acúmulo de gordura no hepatócito. **Materiais e métodos:** Zebrafish adultos de ambos sexos foram divididos em dois grupos: grupo 1 com acesso livre aos próprios ovos e grupo 2 com o fundo do aquário coberto de bolas de vidro para evitar o acesso aos ovos por duas semanas. Para a coleta de sangue, ambos os grupos foram mantidos em jejum pelo período de 24 horas antes da coleta. O IMC foi medido em gramas por centímetro quadrado (g/cm^2). Para coletar as amostras sanguíneas, os animais foram anestesiados e uma incisão, anterior a cauda, foi realizada para acessar a veia dorsal. Uma pipeta automática foi utilizada para coletar o sangue que foi centrifugado obtendo soro para análises. Os níveis séricos de triglicérides e colesterol foram analisados com testes colorimétricos. O fígado foi coletado para análise histológica. O n utilizado foi 4 para cada grupo. Para as análises bioquímicas foram utilizados *pools* de 10 peixes. **Resultados:** Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. Não houve diferença significativa no IMC (grupo 1 $0,037 \pm 0,009 \text{ g}/\text{cm}^2$ e grupo 2 $0,035 \pm 0,008 \text{ g}/\text{cm}^2$) nem nos níveis de colesterol (colesterol total: grupo 1 $362 \pm 73 \text{ mg}/\text{dL}$ e grupo 2 $357 \pm 23 \text{ mg}/\text{dL}$; HDL – colesterol: grupo 1 $91,22 \pm 1,79$ grupo 2 $72,14 \pm 2,89$; LDL – colesterol: grupo 1 $55,68 \pm 10,88$ grupo 2 $44,18 \pm 9,84$). No entanto, houve diferença significativa nos níveis de triglicérides séricos (grupo 1 $457 \pm 43 \text{ mg}/\text{dL}$ e grupo 2 $292 \pm 111 \text{ mg}/\text{dL}$ $P=0,03$). Não foi observado acúmulo de lipídeos nos hepatócitos. **Conclusões:** O acesso aos próprios ovos alterou os níveis de triglicérides sem modificar os níveis de colesterol, alterar o IMC nem acumular gordura nos hepatócitos.

Abstract

Introduction: The Zebrafish eggs that are not fertilized can be a food source for the fish. The aim of this study was to measure the influence of accessing eggs in Body Mass Index, cholesterol and triglycerides serum levels and lipid accumulation in hepatocyte of Zebrafish. **Material and Methods:** Adult Zebrafish of both genders were divided into two groups: group 1 free access to their own eggs and group 2 with the bottom of the aquarium filled with glass balls to prevent them to access their eggs for two weeks. To the blood collection, both groups were kept fasting for 24 hours before the blood collection. The body mass index (BMI) was measure in gram per square centimeter (g/cm^2). To collect the blood samples, animals were anesthetized and an incision was made before the tail to access the dorsal vein. We used an automatic pipette to collect the blood. It was centrifuged and serum was obtained for analysis. Triglycerides and cholesterol seric levels were analyzed with colorimetric tests. The liver was collected to histological analysis. The n used was 4 for each group. *Pools* with serum of 10 animals were used to biochemical analysis. **Results:** The results are expressed in mean \pm standard error. There was no significant difference in BMI (group 1 $0,037 \pm 0,009 \text{ g}/\text{cm}^2$ and group 2 $0,035 \pm 0,008 \text{ g}/\text{cm}^2$) neither in cholesterol levels (total cholesterol: group 1 $362 \pm 73 \text{ mg}/\text{dL}$ and group 2 $357 \pm 23 \text{ mg}/\text{dL}$; HDL – cholesterol: group 1 $91,22 \pm 1,79$ group 2 $72,14 \pm 2,89$; LDL – cholesterol: group 1 $55,68 \pm 10,88$ group 2 $44,18 \pm 9,84$). However, there was a significant difference in triglycerides levels (group 1 $457 \pm 43 \text{ mg}/\text{dL}$ and group 2 $292 \pm 111 \text{ mg}/\text{dL}$ $P=0,03$). Lipid accumulation was not observed in hepatocytes. **Conclusion:** Having access to eggs seams to influence the Zebrafish's triglycerides serum levels without modifying the BMI and cholesterol serum levels neither lipid accumulation in hepatocytes.

1 INTRODUÇÃO

Como um modelo animal de experimentação científica em ascensão, o *Danio rerio* tem sido utilizado em estudos relacionados a diversos campos científicos. As características desse animal e homologia com os mamíferos são as principais razões para o interesse do meio científico no Zebrafish. No entanto, ainda que avançados estudos relacionados a manipulação genética já tenham sido realizados com o Zebrafish, alguns parâmetros funcionais básicos e a influência dos hábitos alimentares desse peixe no seu metabolismo ainda são pouco estudados.

A partir disso, o presente estudo teve como objetivo investigar a influência do acesso aos próprios ovos, e conseqüente ingestão desses ovos visto que o canibalismo se trata de um hábito dessa espécie, no perfil lipídico sérico, no Índice de Massa Corporal e na presença de gordura nos hepatócitos de *Danio rerio*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Zebrafish - Considerações Gerais

O *Danio rerio* é um peixe teleósteo de água doce nativo da Ásia, do sudeste do Himaláia também conhecido como Zebrafish ou Paulistinha. Esse peixe tem o comprimento entre três e quatro centímetros quando adulto, e seu hábito alimentar é onívoro (Westerfield, 2000). Descrito pela primeira vez por Hamilton em 1822, *Danio rerio* é do sub-gênero *Cyprinus*, família *Cyprinidae*, ordem *Cypriniformes* e classe *Actinopterygii*. Ainda que o gênero *Brachydanio* tenha sido utilizado para designar peixes de um tamanho menor e corpo esguio, no qual *Danio rerio* estaria incluso, a denominação correta aceita hoje para Zebrafish é *Danio rerio* (Mayden et al., 2007).

A manutenção e manipulação do Zebrafish estão bem estabelecidas e possuem vantagens em relação aos animais tradicionalmente utilizados para experimentação, como ratos e camundongos. Os peixes são pequenos, ocupam pouco espaço físico e não requerem equipamentos sofisticados. Além disso, outras vantagens da utilização de Zebrafish para experimentação animal são o rápido ciclo de vida - com 96 horas após a fertilização o Zebrafish pode ser comparado a um embrião humano de três meses; a prole numerosa; desenvolvimento externo com larvas transparentes, o que é uma vantagem para estudos embriológicos (Parrng, Seng, Semino, & McGrath, 2002); e a excelente homologia imunológica, fisiológica e molecular com mamíferos (Rosemberg et al., 2008). Devido a essas vantagens o número de estudos desenvolvidos com *Danio rerio* está em ascensão, principalmente nos campos da embriologia, carcinogênese, toxicologia e genética (Lieschke & Currie, 2007).

A habilidade de manipulação genética e desenvolvimento de mutantes assim como o mapeamento completo do genoma fizeram com que o Zebrafish se tornasse um excelente modelo de experimentação animal (Anderson, Carten, & Farber, 2011; Driever et al., 1996), importante para estudos de doenças, de aspectos toxicológicos e de desenvolvimento. O sequenciamento do seu genoma e a relativa facilidade com que alterações genéticas podem ser realizadas levaram ao desenvolvimento de diversos mutantes de Zebrafish para estudo de doenças humanas tais como neoplasias, doenças cardiovasculares, neurológicas entre outras (Best & Alderton, 2008; Guyon et al., 2007; Lieschke & Currie, 2007; Zon & Peterson, 2005).

O aumento da prevalência de doenças relacionadas ao desequilíbrio do metabolismo dos lipídeos, tais como aterosclerose, obesidade e diabetes tipo 2 coloca o metabolismo dos lipídeos em evidência para o desenvolvimento de pesquisas. Embora estudos citológicos experimentais trouxessem avanços importantes, a transposição do modelo celular para um modelo animal é sempre desafiadora (Höltkä-Vuori et al., 2010).

A escolha de um modelo experimental sempre traz vantagens e desvantagens (Lieschke & Currie, 2007). A *Drosophila melanogaster*, por exemplo, tem como um dos aspectos vantajosos a fácil manipulação genética, porém o estudo de órgãos e tecidos é difícil. A manipulação genética em roedores, por outro lado, é lenta, de alto custo e o estudo dos órgãos e tecidos *in situ* não é facilmente acessível (Höltkä-Vuori et al., 2010). Por ser um vertebrado, o Zebrafish tem o desenvolvimento e o metabolismo bastante similar ao dos mamíferos, além de ser um animal de fácil

manipulação. A prole numerosa é também uma vantagem, uma vez que permite um rastreamento em larga escala, assim como a utilização de estratégias de manipulação genética permitem produzir espécies *knockout*, transgênicos e mutantes. Baseando-se nesses aspectos, o Zebrafish vem sendo considerado um modelo experimental adequado para pesquisas em metabolismo de lipídeos (Hölttä-Vuori et al., 2010).

Mesmo com um perfil favorável para estudos do metabolismo dos lipídeos, o Zebrafish é um novato nesse campo. A partir das vantagens descritas anteriormente, *Danio rerio* é um modelo adequado para a etapa seguinte à experimentação celular. A transposição dos achados dos experimentos celulares para organismos vivos inteiros foi facilitada a partir da utilização dos peixes no âmbito da pesquisa experimental (Hölttä-Vuori et al., 2010).

Lieschke e Currie publicaram em 2007 (Lieschke & Currie, 2007) uma relação de modelos de doenças humanas que utilizaram Zebrafish como animal experimental. Uma versão resumida do quadro publicado pelos autores está representada na tabela 1:

Tabela 1: Relação de modelos de doenças metabólicas e nutricionais humanas que utilizam Zebrafish como animal experimental.

Doença, processo patológico ou exposição	Estratégia utilizada	Fenótipo e/ou estudo da patogênese da doença
Doenças metabólicas		
Distúrbios do armazenamento do ferro (Donovan et al., 2000) (R. E. Fleming & Sly, 2001)	Mutação ENU-induzida afetando ferroporinas	Descoberta do transportador de ferro basolateral e posterior implicação na Hemocormatose tipo IV
Porfíria (exemplificando erro inato do metabolismo) (H. Wang, Long, Marty, Sassa, & Lin, 1998) (Childs et al., 2000)	Mutação ENU-induzida afetando enzimas da síntese do heme	Anemia sensível a luz e hemólise
Doenças endócrinas		
Hipotireoidismo (Elsalini & Rohr, 2003) (S. H. Lam, Sin, Gong, & T. J. Lam, 2005)	Exposição do embrião a fármacos	Hipotireoidismo bioquímico com efeitos no desenvolvimento
Excesso do hormônio do crescimento (Biga et al., 2005)	Superexpressão transgênica ou administração direta	Aumento da massa muscular
Doenças nutricionais		
Jejum e jejum prolongado (Goldsmith, Iovine, Reilly-pol, & Johnson, 2006)	Restrição de alimentos	Afeta o crescimento das nadadeiras
Deficiência de vitaminas (Jagadeeswaran & J P Sheehan, 1999)	Antagonista da vitamina K através da administração de warfarin	Anti-coagulação

Fonte: Adaptação de Lieschke e Currie, 2007. ENU: n-Etil-n-Nitrosurea

2.2 Aspectos anatômicos e fisiológicos do Zebrafish

Como mencionado anteriormente, o Zebrafish é um modelo em ascensão que ainda não é tão vastamente conhecido como modelo de experimentação animal. A fim de fornecer algumas informações básicas a respeito de suas anatomia e fisiologia este capítulo foi inserido.

2.2.1 Sistema Digestório

O sistema digestório tem como função a digestão, absorção e excreção de nutrientes, além da função de barreira protetora ao ambiente externo (Di Giulio & Hinton, 2008). Em peixes, a boca e cavidade bucal são consideradas estruturas pertencentes a ambos os sistemas: respiratório e digestório (Roberts & Ellis, 2001). A função da cavidade bucal para o sistema digestório limita-se à seleção, apreensão e direcionamento dos alimentos ao intestino (Menke, Spitsbergen, Wolterbeek, & Woutersen, 2011). O Zebrafish não apresenta estômago e o esôfago se diferencia em intestino, que consiste em um tubo longo inicialmente largo e progressivamente mais estreito no sentido rostral-caudal (Menke et al., 2011). A região das vilosidades e criptas intestinais é homóloga a dos mamíferos, em estrutura e função (Di Giulio & Hinton, 2008).

Sendo assim, um pequeno esôfago distensível e intestino delgado e grosso são as principais estruturas do tubo digestório (Di Giulio & Hinton, 2008). Estruturas como faringe e dentes, utilizados para a fragmentação dos alimentos, também estão presentes (Roberts & Ellis, 2001). O tecido pancreático não se concentra apenas no pâncreas, também é possível encontrar tecido pancreático endócrino ao longo do

intestino e os ácinos exócrinos são muito semelhantes aos dos mamíferos (Ellis, 2001).

O fígado do Zebrafish é constituído por três lobos que se encontram em torno do trato digestório, semelhante ao fígado dos mamíferos (Roberts & Ellis, 2001). Entre os aspectos estruturais e funcionais do fígado, são elencadas algumas características principais: (a) as funções metabólicas e exócrinas são exercidas pela mesma célula, o hepatócito; (b) há irrigação sanguínea tanto arterial (através da aorta dorsal), quanto venosa (através da veia porta) (Di Giulio & Hinton, 2008). Nos peixes, a veia porta, as artérias hepáticas e os ductos biliares estão distribuídos estocasticamente dentro do parênquima hepático e não agrupado num trato portal, como em mamíferos (Tao & Peng, 2009).

O metabolismo de carboidratos, proteínas, lipídeos e vitaminas é exercido pelo fígado, além do papel fundamental na detoxificação de substâncias; na síntese de proteínas séricas, como albumina e fibrinogênio; na síntese de fatores complementares e de proteínas de fase aguda, esse órgão tem outras funções. As principais diferenças anatômicas entre o fígado do Zebrafish e o dos mamíferos é a ausência de organização em lóbulos e da tríade portal. Do ponto de vista histológico, observa-se a inexistência das células de Kupffer (Menke et al., 2011). A representação gráfica se encontra na figura 1.

Algumas diferenças também são observadas no âmbito fisiológico. Em humanos, a organização do parênquima hepático, conceituada como ácino hepático, apresenta-se como uma massa parenquimatosa irregular arranjada em torno de um pequeno trato portal, o qual consiste de arteríola hepática, vênula portal, ducto biliar,

vasos linfáticos e nervos. A estrutura acinar é encontrada entre duas ou mais veias centrolobulares. Entre a tríade porta e a veia hepática central, existem três zonas que se diferenciam em sua composição enzimática, nutrição e oxigenação sanguínea (Wanless, 2007). Em geral, os nutrientes e oxigênio são mais concentrados na região periportal, a zona 1, e vão diminuindo conforme se aproximam da região perivenular, passando pela zona 2 e 3. As enzimas envolvidas no ciclo do Ácido Cítrico, gliconeogênese, na síntese de uréia e colesterol, no catabolismo de aminoácidos e na secreção de ácido biliar são mais presentes na zona 1. Já as reações como a glicólise, lipogênese e as enzimas de detoxificação de drogas, como a citocromo P450, estão altamente expressas na zona 3 (Sherlock & Dooley, 2002). No Zebrafish, as enzimas de biotransformação são homogeneamente distribuídas por todo o fígado, não tendo predileção por locais próximos a veias centrais, por exemplo (Figura 1).

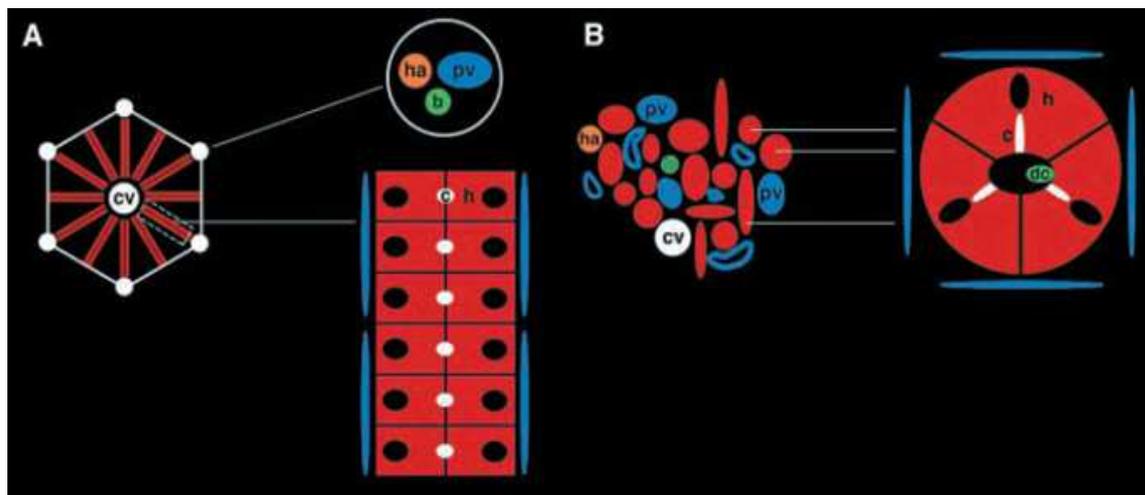


Figura 1: Representação gráfica da estrutura hepática de mamíferos e do Zebrafish. A) Estrutura da tríade hepática de mamíferos com arquitetura preservada. B) Estrutura hepática do Zebrafish diferentemente dos mamíferos, sem a arquitetura preservada.

Fonte: Adaptado de Lorent et al, 2004.

Para sintetizar as diferenças entre o fígado de peixes, roedores e humanos, o tabela abaixo compara as características anatômicas e histológicas do fígado.

Tabela 2: Síntese das diferenças entre o fígado de peixes, roedores e humanos.

Característica	Roedores	Peixes	Humanos
Lobos hepáticos	Múltiplos	Geralmente único em peixes, no Zebrafish são 3 lobos	Quatro
Arquitetura lobular	Presente	Ausente	Presente
Trato portal	Presente clássica tríade porta (ducto biliar, veia porta e artéria hepática)	Ausente	Presente clássica tríade porta (ducto biliar, veia porta e artéria hepática)
Irrigação sanguínea	Duplo: artéria hepática e veia porta	Duplo: artéria hepática e veia porta	Duplo: artéria hepática e veia porta
Drenagem venosa	Veias hepáticas em direção a veia cava	Veias hepáticas em direção ao sinus venosus	Veias hepáticas em direção a veia cava
Sistema biliar	Rede de canalículos nos lóbulos. Colangiólolos (Ductos de Herin) e pequenos ductos biliares nos tratos porta e grandes ductos biliares intra-hepáticos no hilo hepático	Canalículos que se comunicam com a luz dos túbulos hepáticos distribuídos estocasticamente e colangiólolos no centro dos túbulos	Rede de canalículos nos lóbulos. Colangiólolos (Ductos de Herin) e pequenos ductos biliares nos tratos porta e grandes ductos biliares intra-hepáticos no hilo hepático
Células de Kupffer	Presentes	Ausentes	Presentes
Macrófagos perisinusoidal	Presentes	Presentes	Presentes
Agregados de	Ausentes	Presentes	Ausentes

macrófagos

Fonte: Adaptado de Di Giuglio e Hinton, 2008 (Di Giulio & Hinton, 2008)

2.2.2 Sistema Hematológico

Os ossos do Zebrafish não apresentam cavidade medular, como é encontrado em mamíferos, e o tecido hematopoiético encontra-se no rim e no baço. Nos adultos, a hematopoiese ocorre no interstício anterior e posterior do rim (Menke et al., 2011). Os animais não possuem linfonodos, a filtração de substâncias externas e de células sanguíneas defeituosas fica a cargo do rim e do baço. Do ponto de vista macroscópico, o baço é um órgão vermelho escuro localizado na cavidade peritoneal adjacente a um dos lobos hepáticos. O timo é um órgão anexado à cavidade braquial e, como em mamíferos, tem como função a maturação dos linfócitos (Menke et al., 2011).

2.2.3 Sistema Urinário

Os rins no Zebrafish são semelhantes aos rins dos mamíferos. Apresentam néfrons, glomérulos, túbulos proximais e distais e ductos coletores. No interstício renal é que são encontradas as células hematopoiéticas (Menke et al., 2011).

2.2.4 Sistema Vascular

A circulação é fechada, simples e completa. Simples porque passa apenas uma vez pelo coração a cada ciclo de circulação, no entanto, o sangue oxigenado se mistura com o não oxigenado. O sangue venoso se desloca para o sinus venoso e, posteriormente, através da válvula sino atrial, para o átrio. A contração do átrio e a dilatação do ventrículo induzem a passagem do sangue para o ventrículo, através da válvula átrio ventricular. A contração do ventrículo gera a pressão necessária para o

bombeamento do sangue para o interior do bulbo arterial, via válvula ventrículo-bulbar (Hu, Yost, & Clark, 2001). Do coração, a aorta distribui o sangue para as brânquias, onde este será oxigenado, através das artérias branquiais aferentes (Menke et al., 2011).

2.2.5 Sistema Respiratório

As funções principais das brânquias nos peixes estão relacionadas às trocas gasosas, à osmoregulação e ao equilíbrio ácido-básico (Di Giulio & Hinton, 2008). A água passa para a parte interna das brânquias através da boca. O sangue flui, através das artérias aferentes, para os espaços branquiais, onde o CO₂ é liberado e o O₂ é absorvido. O sangue oxigenado se distribui através de artérias lamelares eferentes que alimentam a aorta dorsal, de onde o sangue é distribuído para os tecidos. (Menke et al., 2011).

2.3 Características dos ovos de Zebrafish

Zebrafish são peixes ovíparos e suas fêmeas põem de 50 a 200 ovos diariamente (Nagel, 1993). Os ovos maduros de Zebrafish são ovócitos em metáfase II, depois de completar o processo ovulatório (Figura 2) (Lubzens, Young, Bobe, & Cerdà, 2010). Esses ovos contem DNA e RNA polimerases, proteínas de cromatinas histonadas e não histonadas, fatores de transcrição e tradução, rRNA, tRNA e mRNA materno. Além disso, os ovos maduros contem vitaminas e fatores de crescimento com funções determinadas durante o crescimento embrionário. A função de proteção do embrião do ambiente externo é exercida pelas proteínas da parte externa dos ovos que possuem também fatores antimicrobianos.

Os ovos de vertebrados em geral são cobertos por uma camada de vitelina conhecida como envelope, membrana de vitelina, cápsula do ovo ou membrana radiante (Modig et al., 2006). Esse envelope é formado por três camadas principais, ricas em proteínas: membrana plasmática e duas camadas acelulares depositadas pelo ovócito (Lubzens et al., 2010).

A gema do ovo do Zebrafish é vastamente depletada durante a primeira semana de desenvolvimento larval. A maioria dos lipídeos da gema é neutra (triacilgliceróis e esteres estéreis) e fosfolipídeos polares, em especial fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina. A proporção de lipídeos dos ovos de cada espécie de teleósteo varia significativamente (Hölttä-Vuori et al., 2010).

O grau de depleção dos lipídeos presentes na gema é capaz de sinalizar o estágio de desenvolvimento embrionário. Alguns estudos indicam que os lipídeos da gema são entregues aos tecidos em desenvolvimento, através de lipoproteínas carreadoras (Hölttä-Vuori et al., 2010).

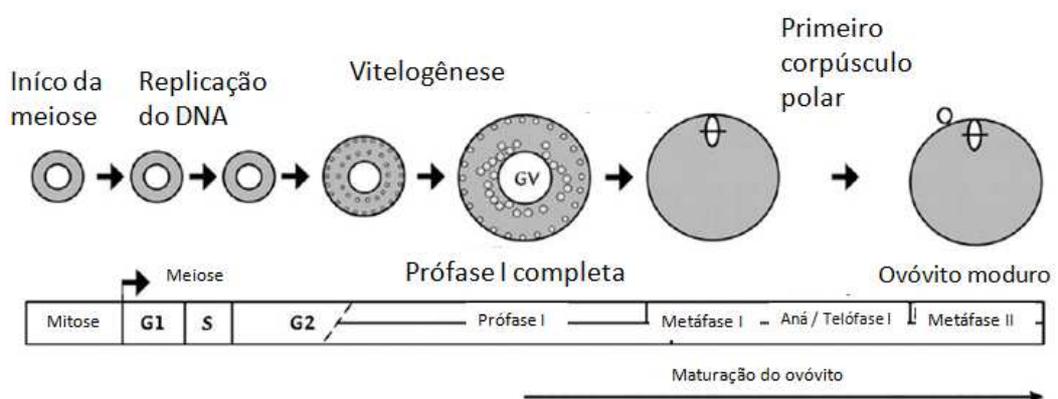


Figura 2: Descrição esquemática dos estágios de desenvolvimento do ovócito de peixes teleósteos.

Fonte: Adaptado de Suwa e Yamashita, 2007.

2.4 Acúmulo de lipídeos nos ovos de Zebrafish

Durante a formação dos ovos, um dos processos de acúmulo de nutrientes é chamado de vitelogênese. Esse é o termo geralmente utilizado para descrever a incorporação de proteínas vitelogeninas ao ovócito e a sua transformação em proteínas encontradas na gema. No entanto, esse termo deveria ser estendido para incluir a incorporação de outras moléculas, como lipídeos e vitaminas, à gema. Ao final do processo de vitelogênese, o ovócito é capaz de ser fertilizado e contém mRNA materno, proteínas, lipídeos e carboidratos, vitaminas e hormônios necessários para o desenvolvimento do embrião (Wallace, Akhter, Smith, Lorent, & Pack, 2005).

O acúmulo de lipídeos no ovócito ocorre na gema e se origina de vitelogeninas e de proteínas de muito baixa densidade (VLDL) do plasma do peixe. Os receptores dessas duas lipoproteínas estão envolvidos no processo de captura de lipídeos do plasma e passagem desses lipídeos para o ovócito (Davail et al., 1998; Prat, Coward, J P Sumpter, & C R Tyler, 1998). As moléculas envolvidas nesse processo foram reconhecidas. São discutidos dois mecanismos: os lipídeos seriam sequestrados da VLDL do plasma do peixe, ou sofreriam ação da lipase. A primeira hipótese ocorreria devido à ligação da apolipoproteína B (ApoB), presente nos receptores de VLDL do sangue, que se desprenderia do VLDL do sangue e se ligariam com a lipoproteína VLDL ou com a vitelogenina, ancorados na membrana plasmática do ovócito, caracterizando a transferência dos lipídeos do sangue para o ovo. Além desse, outro mecanismo foi proposto. Os lipídeos sofreriam ação da lipase, presente na lipoproteína aderida ao endotélio, permitindo a migração dos

ácidos graxos. Uma vez que as lipoproteínas são internalizadas no ovo, os triglicérides da VLDL sofrem lipólise e são transformados em ácidos graxos. Esses sofrem esterificação, resultando em lipídeos neutros que são armazenados em glóbulos de lipídeos dentro do ovo (Luckenbach, Iliev, Frederick W Goetz, & Swanson, 2008).

Quando os ovos não são fertilizados, há a possibilidade de que esses sejam ingeridos pelos peixes. Westerfield demonstrou que na produção dos ovos há uma utilização acentuada das proteínas corporais dos peixes (Westerfield, 2000). Assim, segundo o autor, os ovos seriam ingeridos a fim de aumentar o aporte protéico da dieta.

2.5 Metabolismo dos lipídeos no Zebrafish

Como pescilotérmicos, os peixes precisam alterar a composição de seus lipídeos em função das mudanças de temperatura no ambiente. Em baixas temperaturas, o peixe precisa aumentar a proporção de fosfolipídeos insaturados das membranas celulares a fim de manter a viscosidade da membrana celular (Hölttä-Vuori et al., 2010).

Os primeiros pré-adipócitos viscerais surgem, durante o desenvolvimento do peixe, junto com o pâncreas, muito próximo ao período em que a alimentação externa inicia (Flynn, Trent, & Rawls, 2009). Os peixes armazenam lipídeos na forma de triacilgliceróis (TAG) em depósitos de adipócitos no tecido visceral, intramuscular e subcutâneo (Song & Cone, 2007).

No estágio de embrião ou larva, os lipídeos utilizados pelos primeiros quatro dias, após a fertilização, são provenientes da gema (Figura 3 A). Por volta do sétimo dia, após a fertilização, apenas o preenchimento surfactante da bexiga natatória é corado com *Oil red* (Figura 3 B). Mutações são capazes de causar um acúmulo inapropriado de lipídeos, no fígado, músculo esquelético e cardíaco e vasculatura (Figura 3 C).

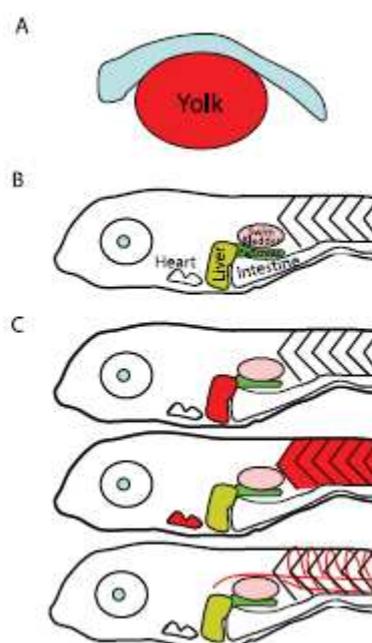


Figura 3: Anatomia da larva de Zebrafish e detecção de mutações na homeostase dos lipídeos.

Fonte: (Schlegel & D. Y. R. Stainier, 2007)

No Zebrafish, desde a sua forma larval, as principais células envolvidas na absorção e no processamento dos lipídeos estão presentes, tais como enterócitos, adipócitos, hepatócitos e células acinares do pâncreas (Wallace et al., 2005). Durante os primeiros quatro dias após a fecundação, o embrião de Zebrafish usufrui do estoque de nutriente presente no saco vitelínico. Os lipídeos presentes na gema

são fonte não só de triglicérides, mas também de vitaminas lipossolúveis e colesterol, essencial para a membrana celular e para a produção de ácidos biliares (P J Babin et al., 1997; Bownes, 1992). Os lipídeos presentes no ovo do Zebrafish tornam-se disponíveis para o desenvolvimento do embrião a partir das enzimas de mobilização e lipoproteínas de transporte, que se encontram na camada sincicial da gema (YSL - yolk syncytial layer) (P J Babin et al., 1997; Marza et al., 2005). A partir do aparecimento do sistema circulatório, que no Zebrafish ocorre de 12 a 30 horas após a fertilização do gameta, os lipídeos presentes na gema, nos hepáticos e no intestino são transportados, através de lipoproteínas, para os tecidos alvos. Os lipídeos da gema são completamente consumidos ao final de cinco ou seis dias após a fertilização, período no qual a larva começa a se alimentar (Hölttä-Vuori et al., 2010).

Zebrafish é um peixe onívoro e, quando se encontra em ambiente selvagem, se alimenta primeiramente de zoo- e fito-plancton, mas também de insetos (Hölttä-Vuori et al., 2010). Quando em ambiente artificial, são alimentados com ração seca que apresentam geralmente um percentual de lipídeos que vai de 8 a 15%. A dieta costuma ter alto teor de lipídeos e ser rica em triacilgliceróis, fosfolipídeos e esteróides. Esses lipídeos, antes de serem absorvidos no intestino, passam por um processo de emulsificação e digestão realizado pela bile e enzimas digestivas.

No Zebrafish a bile é produzida pelos hepatócitos e liberada em uma rede de ductos intra-hepáticos que drenam para a vesícula biliar. A bile é liberada no lúmen intestinal, depois de consumo de alimento, para emulsionar os lipídeos e facilitar a sua absorção pelos enterócitos. A bile é composta por ácidos biliares, fosfolipídeos e sais, que juntos promovem a formação de micelas, se inserindo entre as camadas

duplas de lipídeos e reduzindo a tensão superficial, permitindo a curvatura da membrana (Anderson et al., 2011).

Depois de emulsificados, os triacilgliceróis (TAG) e fosfolipídeos devem ser quebrados pelas lipases do lúmen intestinal liberando ácidos graxos livres ou mono e di acilgliceróis que podem ser absorvidos pelos enterócitos. Os lipídeos absorvidos são acumulados nos enterócitos sob forma de gotas de lipídeos. Esses são utilizados através da via oxidativa nas mitocôndrias, ou são empacotados em quilomícras e secretados na superfície basolaterais dos enterócitos para o sangue e linfa (Anderson et al., 2011).

Sheridan (Sheridan, 1988) propôs um modelo de absorção de lipídeos em peixes em duas etapas, uma rápida e outra lenta. Esse modelo propõe que, na etapa rápida, imediatamente após a ingestão de lipídeos, uma fração dos ácidos graxos da dieta é encontrada no plasma em duas formas: a) cadeias não ligadas a proteínas carreadoras, b) ligados a proteínas carreadoras. A etapa lenta consiste na síntese e transporte de quilomicras ricas em TAG através de um mecanismo similar ao dos humanos. Para Anderson e colaboradores (Anderson et al., 2011), a *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP) é a proteína responsável por empacotar os TAG em lipoproteínas que tem sua expressão e função conservadas no Zebrafish.

Estudos com lipídeos marcados sugerem que peixes e mamíferos produzem quilomícras com lipoproteínas muito similares (Sire, Lutton, & Vernier, 1981) (Skinner & Rogie, 1978). YSL expressa mRNA de diversas lipoproteínas que também são expressas no intestino e fígado de Zebrafish, como proteínas ligantes de ácidos

graxos no intestino (Sharma et al., 2004). Devido à grande similaridade do padrão de expressão observados na YSL e nos órgãos digestivos da larva do Zebrafish, Anderson e colaboradores (Anderson et al., 2011) geraram a hipótese que a utilização dos lipídeos do ovo de Zebrafish, durante o desenvolvimento embrionário, seja um processo altamente análogo ao transporte de lipídeos, mediado por lipoproteínas.

O transporte dos lipídeos por sua vez ocorre de duas formas. O transporte exógeno em que os lipídeos são transferidos do intestino para o fígado e tecidos extra-hepáticos (Paik et al., 2004) através de quilomicras e ácidos graxos ligados a proteínas carreadoras. E o transporte endógeno que envolve o transporte de lipídeos do fígado para outros órgãos e tecidos periféricos (Hölttä-Vuori et al., 2010).

O transporte de lipídeos no fígado e intestino do Zebrafish envolve um maquinário celular muito similar ao dos mamíferos. No lúmen intestinal, TAG, ésteres de colesterol e fosfolipídeos são hidrolisados em ácidos graxos e o colesterol é hidrolisado pelas lípases e pelas colesterol esterases. Os ácidos graxos são transportados da membrana apical dos enterócitos, através de proteínas transportadores de ácidos graxos. Esses ácidos graxos são então acoplados a coenzima A pela acetil coenzima A sintase (AcSCoA), para gerar os TAG e os ésteres de colesterol. No lúmen do retículo endoplasmático, a *microssomal triacylglycerol transfer protein* (MTP) e seu ligante obrigatório, a proteína dissulfeto isomerase (Pdi), agregam lipídeos neutros a ApoB a fim de gerar quilomicras. As quilomicras são secretadas através da membrana basolateral.

Alfa lipoproteínas (partículas de lipoproteínas de alta densidade – HDL) são secretadas pelo intestino, porém o principal local de síntese é no fígado. O fígado resgata ácidos graxos livres provenientes da circulação, através de proteínas transportadoras de ácidos graxos da membrana basolateral, que se encontram na superfície dos hepatócitos. Os ácidos graxos livres resgatados são submetidos à beta oxidação na mitocôndria ou são reincorporados em TAG. O colesterol pode ser esterificado a ácidos graxos e empacotados novamente em VLDL nascente ou sujeito a oxidação e subsequente secreção na bile. A síntese *de novo* do colesterol e ácidos graxos ocorrem no hepatócito. Esse processo é regulado por SREBP (*sterol regulatory element binding protein*) e diversos receptores nucleares. A figura 4 representa um esquema do transporte dos lipídeos em vertebrados.

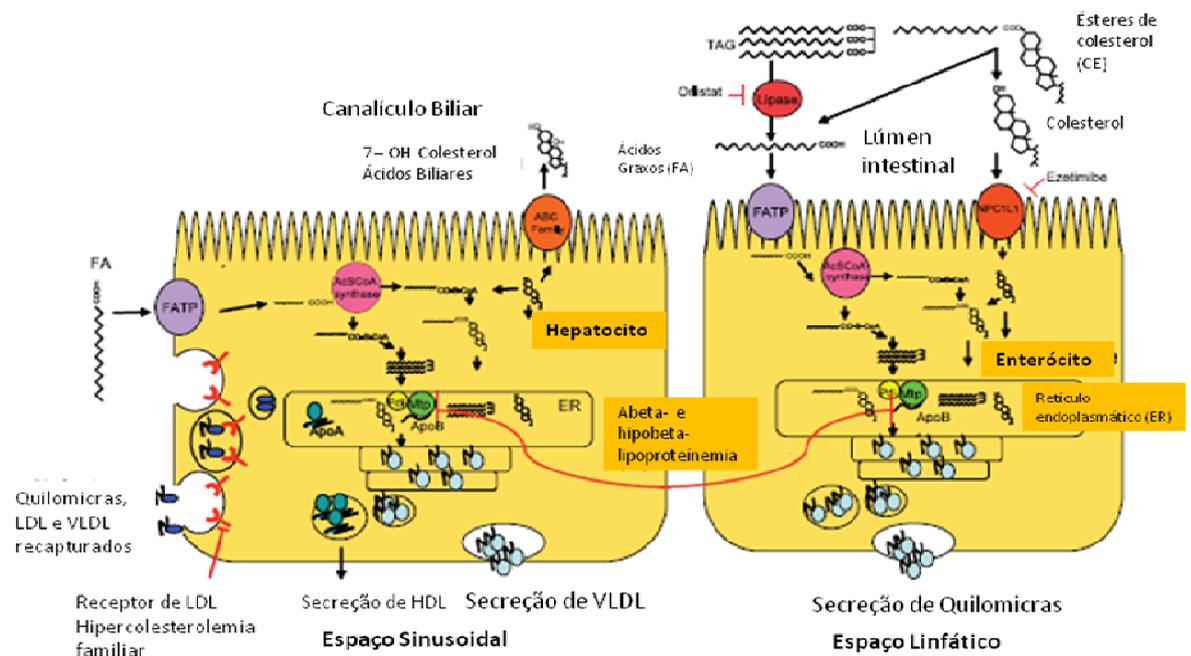


Figura 4: Maquinário de vertebrados para o transporte intestinal e hepático de lipídeos.

Fonte: (Schlegel & D. Y. R. Stainier, 2007)

A circulação desses lipídeos ocorre na forma de lipoproteínas VLDL, LDL, HDL (Hölttä-Vuori et al., 2010). As lipoproteínas nos peixes são comparáveis as dos vertebrados superiores. A lipoproteína predominante em teleósteos, incluindo o *Danio rerio*, é o HDL – colesterol (P. Babin, 1989; Stoletov et al., 2009). Nos mamíferos a maior fração de lipoproteína encontrada é LDL – colesterol. A proporção das lipoproteínas é modulada pela dieta (Stoletov et al., 2009).

Geralmente, os peixes teleósteos são hiperlipidêmicos e hipercolesterolêmicos quando comparados com mamíferos. Os níveis de colesterol plasmático no Zebrafish podem chegar a 800mg/dL (Stoletov et al., 2009) taxa que, em camundongos, só foi possível em animais *knockout* para o receptor de LDL – colesterol. A quantidade de ácido graxo insaturado nas lipoproteínas dos peixes é alta, pode ser superior a 60%.

A biosíntese de colesterol e lipoproteínas é altamente conservada em vertebrados. Devido a isso, fármacos utilizados por seres humanos podem ser utilizados no Zebrafish para estudos das vias metabólicas das lipoproteínas (Thorpe, Doitsidou, Ho, Raz, & Farber, 2004).

Recentemente Kaushik e colaboradores publicaram um estudo inovador a respeito do crescimento e composição corporal do Zebrafish, (Kaushik, Georga, & Koumoundouros, 2011). Os autores investigaram, em uma população de larvas de Zebrafish com dieta padronizada, os aminoácidos essenciais, o perfil protéico ideal, os ácidos graxos totais, neutros e polares além dos minerais e elementos traço. O perfil de ácidos graxos encontrado foi de aproximadamente 15% de ácidos graxos polares, 30% de ácidos graxos monoinsaturados e 30% de saturados são as frações

mais importantes da composição lipídica do Zebrafish. Esse perfil lipídico está diretamente associado a composição de ácidos graxos da dieta.

2.6 Análise bioquímica do sangue de Zebrafish

Há grande dificuldade de encontrar referências especializadas sobre este tema. Os artigos encontrados foram apenas dois. Uma das publicações foi feita por Murtha e colaboradores (Murtha, Qi, & Keller, 2003). Os autores estudaram os níveis séricos de albumina, ALP, ALT, amilase, bilirrubina total, BUN, cálcio, fósforo, creatina, glicose, potássio, proteína total e globulinas em soro de Zebrafish (Tabela 1). Para a análise desses parâmetros bioquímicos foram utilizados 5 *pools* de sangue de 50 animais, perfazendo um total de 250 animais utilizados. As análises foram feitas através de um equipamento especializado, Vetscan Diagnostic Profile II, que realiza testes colorimétricos em pequena escala e em automação. Os valores encontrados pelos autores estão na tabela 1:

Tabela 1. Análises bioquímica séricas para Zebrafish

	Média ± DP	Amplitude
Albumina	3,0 ± 0,2 g/dl	2,7 – 3,3 g/dl
ALP	2,0 ± 4,5 U/L ^a	0,0 – 10,0 U/L ^a
ALT	367,0 ± 25,3 U/L	343 – 410 U/L
Amilase	2331,4 ± 520,6 U/L	1898,0 – 3195 U/L
Bilirrubina total	0,38 ± 0,1 mg/dl	0,2 – 0,6mg/dl
BUN	3,2 ± 0,4mg/dl	3,0 – 4,0 mg/dl
Cálcio	14,7 ± 2,3 mg/dl	12,3 – 18,6 mg/dl
Fósforo	22,3 ± 1,5 mg/dl	20,3 – 24,3 mg/dl
Creatinina	0,7 ± 0,2 mg/dl	0,5 – 0,9 mg/dl
Glicose	82,2 ± 12,0 g/dl	62,0 – 91,0 g/dl
Potássio	6,8 ± 1,0 mEq/L	5,2 – 7,7 mEq/L
Proteína total	5,2 ± 0,5 g/dl	4,4 – 5,8 g/dl
Globulina	2,1 ± 0,6 g/dl	1,3 – 2,8 g/dl

^a Os valores de ALP foram inconsistentes e tiveram desde valores negativos para 10U/L.

ALP = Fosfatase alcalina; ALT = Alanina aminotransferase; BUN = Nitrogênio Uréico Sanguíneo

Fonte: Murtha et al, 2003.

Com esse estudo foi possível observar que os níveis de ALT, amilase e fósforo estão acima da amplitude de normalidade para mamíferos. Os autores discutiram esses resultados esclarecendo que os valores de fósforos encontrados foram pouco acima dos valores daqueles demonstrados no guia de referência veterinária (Eastman Kodak Company, 1993) e que os níveis de alanina transaminase e amilase foram provavelmente aumentados devido a presença de hemólise em algumas amostras (Willard, Tvedten, & Turnwald, 1989).

Em 2010, Eames e colaboradores verificaram a glicemia dos peixes, a fim de estudar a dinâmica e a homeostase da glicose em Zebrafish. Os autores utilizaram diversos aparelhos de hemoglicose com a intenção de utilizar pequenas quantidades de sangue (Eames, Philipson, Prince, & Kinkel, 2010). Para as mensurações de glicose os peixes eram mantidos em jejum por 24 horas antes da coleta de sangue. Para garantir o jejum, o fundo do aquário era coberto por 2 a 3 camadas de bolinhas de vidro que impediam o acesso dos peixes aos próprios ovos. A média dos valores encontrados foi 80mg/dL e os autores concluíram que esses medidores portáteis de glicemia poderiam ser utilizados também para Zebrafish.

Os valores bioquímicos séricos para Zebrafish foram raramente publicados, sendo esse um dos fatores que impulsionaram a realização deste estudo.

3 JUSTIFICATIVA

O Zebrafish já foi consagrado como um modelo experimental para estudos de desenvolvimento e de manipulação genética, devido a suas características de reprodução e desenvolvimento e por seu genoma ter sido completamente sequenciado. Ultimamente, tem-se encorajado o uso do peixe para estudos fisiológicos, uma vez que há grande homologia entre o *Danio rerio* e mamíferos.

Por outro lado, para explorar o potencial do Zebrafish adulto como modelo para doenças humanas, algumas ferramentas e alguns parâmetros ainda são insuficientes. Os aspectos relacionados à alimentação e os parâmetros sanguíneos de avaliação funcional ainda não foram completamente consolidados. Há raros estudos a este respeito na literatura. Técnicas básicas e simples, como coleta de sangue e análises bioquímicas através de testes colorimétricos, são de grande importância prática. Experimentos que investiguem aspectos nutricionais capazes de influenciar o metabolismo do Zebrafish também são necessários.

4 HIPÓTESE

Devido ao alto valor nutricional dos ovos de Zebrafish, os valores de colesterol e triglicérides devem ser mais altos no grupo com acesso aos ovos, quando comparados com o grupo que não teve acesso aos ovos. A possível utilização desses como fonte energética pode induzir o acúmulo de gordura nos hepatócitos e aumento do Índice de Massa Corporal (IMC).

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Analisar a influência do acesso do Zebrafish aos próprios ovos no índice de massa corporal, nos níveis de colesterol e triglicérides séricos e na presença de acúmulo de gordura nos hepatócitos.

5.2 Objetivos Específicos

Otimizar a coleta de sangue do Zebrafish.

Padronizar as reduções necessárias dos reagentes de cada um dos kits de testes colorimétricos comerciais utilizados para análise dos lipídeos séricos.

Analisar os níveis séricos de colesterol total, HDL – colesterol, LDL – colesterol e triglicérides no soro de Zebrafish adulto com testes colorimétricos comerciais.

Avaliar o acúmulo de gordura nos hepatócitos utilizando técnica histológica

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Local

Os animais foram alocados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os experimentos da padronização dos kits e análise das amostras de soro foram realizados no Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG) e na Unidade de Análise Molecular e Proteínas (UAMP). A análise das amostras histológicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Experimental.

6.2 Animais e aquários

Foram utilizados ao todo 88 peixes *Danio rerio wild-type* adultos, adquiridos em loja de aquarismo, 80 peixes para as análises sanguíneas e 8 peixes para as análises histológicas. Os peixes foram mantidos em aquários em uma densidade de 5 peixes para cada litro de água, a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, com ciclo de 10 horas de escuro e 14 horas de luz e constante aeração. Antes de preencher com água, o aquário dos peixes do grupo que não teve acesso os próprios ovos, recebeu duas camadas de pequenas bolas de vidro, que preencheram o fundo. As bolas de vidro eram alocadas cuidadosamente para que o fundo ficasse completamente preenchido. Com o fundo do aquário devidamente preenchido, a água era lentamente derramada para não mover as bolas de vidro do fundo. Antes do início de qualquer experimento, os peixes aclimatavam-se ao novo aquário pelo período mínimo de uma semana.

6.3 Tamanho da amostra

A partir de um experimento piloto foram obtidos os dados necessários para o cálculo do tamanho amostral. Para as análises bioquímicas de colesterol total o n calculado foi três. Para as análises bioquímicas de HDL – colesterol, LDL – colesterol e triglicérides e para as análises histológicas o n calculado foi quatro para cada grupo, oito ao total. Para as análises bioquímicas de colesterol e triglicérides cada amostra representou um *pool* de 10 peixes. Ao total, o número de peixes utilizado para as análises bioquímicas foi 80, e para as análises histológicas, oito.

Uma margem de 15% foi calculada para a compra dos animais, visto que a mortalidade dos peixes durante a aclimação e o experimento é bastante variável. O número total de animais comprados foi 101.

6.4 Desenho experimental

Todos os animais foram pesados e medidos antes e ao final dos 14 dias de experimento. Durante o período experimental, os animais foram divididos em dois grupos: um em que os peixes tiveram livre acesso ao fundo do aquário e, conseqüentemente, aos próprios ovos; outro em que o fundo do aquário era coberto com duas camadas de pequenas bolas de vidro a fim de impedir o acesso dos peixes aos próprios ovos. Ao final de 14 dias, após serem novamente pesados, os peixes recebiam anestesia, o sangue era coletado e processado para a obtenção do soro e posteriormente o soro era analisado com testes colorimétricos comerciais padronizados para baixa escala. Para as análises histológicas, quatro peixes de cada grupo tiveram o fígado retirado. O tempo de 14 dias de experimento foi

escolhido devido a achados do nosso grupo que foram capazes de encontrar acúmulo de lipídeos em hepatócito de Zebrafish após 14 dias de exposição ao álcool á 0,5%.

6.5 Alimentação

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial própria para peixes. A ração utilizada para os dois grupos do estudo foi a mesma e suas especificações estão no quadro 1.

Quadro 1: Níveis de garantia dos nutrientes da ração utilizada.

Níveis de Garantia:	
Umidade (máx.)	9 %
Proteína bruta (mín.)	34 %
Extrato etéreo (mín.)	5,5 %
Matéria fibrosa (máx.)	15 %
Matéria mineral (máx.)	12 %
Cálcio (máx.)	3,5 %
Fósforo (mín.)	0,8 %

Fonte: Site do fabricante:

<http://www.alconpet.com.br/produto.php?prodCod=27>

A partir das especificações fornecidas pelo fabricante, foi possível calcular a quantidade de energia bruta e digerível (energia proveniente dos nutrientes que o animal tem capacidade de digerir). A quantidade de energia fornecida por cada nutriente está presente na tabela 3:

Tabela 3: Energia fornecida por cada nutriente da ração dos peixes.

Nutriente	Energia Bruta (kcal/g)	Energia digerível (kcal/g)
Proteína bruta	5,65	4,40
Extrato etéreo	9,40	9,40
Matéria fibrosa	4,15	4,15

Fonte: Nutrição animal. Volume 1 As bases e os fundamentos da nutrição animal (Andriguetto, 2002).

A partir dessas informações, a energia bruta da ração foi calculada em 306,05 kcal por 100g de ração e a energia digerível, 263,55 kcal por 100g. No extrato etéreo são encontrados os lipídeos da ração.

6.6 Peso e comprimento dos peixes e cálculo do IMC

A pesagem dos peixes foi realizada em uma balança de precisão (Marte, Modelo AS5500C), em um recipiente com apenas água do aquário. O método utilizado foi peso diferencial. Individualmente, os peixes foram retirados do aquário com uma rede apropriada, colocados nesse recipiente para pesagem e rapidamente colocado de volta em um novo aquário, a fim de que o estresse fosse mínimo. Esse processo foi repetido para a aferição de peso de cada animal.

Assim como a aferição de peso, a aferição de comprimento dos animais foi realizada antes e ao término do período de experimentação, através de um paquímetro. Com uma rede apropriada, os peixes eram pescados do aquário,

colocados lateralmente sobre uma superfície plana e lisa, e rapidamente a medida do ponto mais externo da cabeça ao ponto mais externo da nadadeira caudal era aferida. A duração desse procedimento era inferior a 15 segundos.

O índice de massa corporal dos peixes foi calculado, segundo Oka e colaboradores, dividindo o peso do animal em gramas pelo seu comprimento em centímetros ao quadrado (Oka et al., 2010).

6.7 Coleta e processamento do sangue

Antes da coleta de sangue, os peixes eram individualmente anestesiados através de imersão completa do peixe em um recipiente com flocos de gelo e água do aquário a aproximadamente 4°C. O tempo de anestesia era individualizado e os peixes foram considerados anestesiados depois de não responderem a estímulos externos.

Os peixes foram colocados em jejum 24 horas antes da coleta de sangue (Eames et al., 2010). Nesse período, além de não receberem alimento, o fundo do aquário do grupo que teve acesso aos ovos também foi coberto com pequenas bolas de vidro, a fim de que os ovos não pudessem ser acessados nem utilizados como alimento por nenhum dos grupos.

Os peixes em jejum, logo após a anestesia, eram colocados em uma placa de vidro e, rapidamente, uma incisão com uma lâmina de aço era feita entre a nadadeira caudal e a nadadeira anal (figura 5). O sangue que vertia dessa incisão era coletado com uma micropipeta (P20) com uma ponteira de baixa retenção de

líquidos, e colocado em um microtubo. A quantidade de sangue coletada de cada peixe variou de 5 a 20 μl .

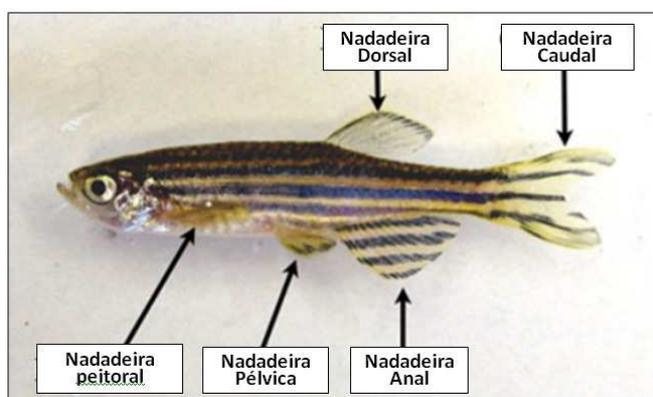


Figura 5: Localização anatômica e nomenclatura das nadadeiras do Zebrafish.

Fonte: Adaptado de Kinkel *et al*, 2010.

Para compor os *pools* de cada amostra, o sangue coletado de dez peixes, em um intervalo máximo de dez minutos, foi colocado em um mesmo tubo. O *pool* de sangue foi centrifugado a 0,5 *g* por 10 minutos (Eppendorf Centrífuga 5415D, Eppendorf, Alemanha) para a obtenção do soro.

6.8 Padronização e utilização dos kits Colorimétricos

Para a análise do soro, foram utilizados kits de testes colorimétricos comerciais para colesterol total, HDL - colesterol, LDL - colesterol e triglicérides (Labtest Diagnóstica, Brasil).

A fim de adaptar os testes colorimétricos ao padrão de pequenos volumes sanguíneos do Zebrafish, uma redução de escala padronizada foi realizada para cada um dos reagentes dos kits. A padronização foi feita primeiramente através de amostras controles de soros sintéticos (Precipath, Precinorm U plus, Roche/Hitachi

Analyzers, Cobas®) com parâmetros bioquímicos previamente conhecidos, fornecidos pelo laboratório que os fabrica. Havia dois tipos de soro sintético, um cujos valores bioquímicos estavam dentro dos padrões de normalidade para humanos e outro com valores fora deste padrão. Os valores de referência dos soros sintéticos estão apresentados na tabela 4:

Tabela 4: Valores de colesterol e triglicérides dos soros sintéticos.

	Valores do padrão de normalidade (mg/dL)	Valores fora do padrão de normalidade (mg/dL)
Colesterol total	80	220
HDL – colesterol	50	20
LDL – colesterol	150	200
Triglicérides	110	170

A padronização das reduções dos testes colorimétricos foi feita em triplicata, com a utilização dos soros sintéticos. As reduções das quantidades de amostra e reagentes utilizados foram gradativas e proporcionais. A sequência de reduções dos testes iniciaram com a proporção de 100% em relação aos volumes indicados pelo fabricante que foram reduzidas subsequentemente para 50%, 40%, 30%, 20%, e 10%. A menor redução capaz de apresentar estabilidade nos resultados foi testada novamente, também com amostras de soro sintético em triplicata, para a certificação da confiabilidade do teste.

A menor quantidade de soro sintético capaz de reproduzir os valores indicados pelo fabricante dos soros, com uma margem de menos de 10% de variação entre o valor indicado pelo fabricante e o encontrado no teste, foi utilizada para as análises com o soro de Zebrafish.

A fim de garantir a estabilidade dos testes realizados com o soro de sangue de Zebrafish, amostras dos soros sintéticos, utilizados na padronização dos testes, foram analisadas em triplicata simultaneamente com as amostras de Zebrafish.

Para realizar as dosagens de colesterol, foram necessários três tipos diferentes de amostras. A amostra branco, que continha apenas reagente 1 (tampão 50 mmol/L, pH 7,0; fenol 24 mmol/L; colato de sódio 500 μ mol/L; azida sódica 15 mmol/L; 4-aminoantipirina 500 μ mol/L; colesterol esterase \geq 250 U/L, colesterol oxidase \geq 250 U/L e peroxidase \geq 1000 U/L); a amostra padrão continha reagente 1 e reagente padrão (colesterol 200mg/dL azida sódica 15mmol/L); e a amostra teste continham reagente 1, além das amostras de soro a serem analisadas. As absorbâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro a 500nm. Os volumes sugeridos pelo fabricante são, na amostra Branco, 1 mL de reagente 1, na amostra padrão são 1mL de reagente 1 e 10 μ l de reagente padrão e nas amostras teste são 1ml de reagente 1 e 10 μ l de amostra.

A tabela 5 demonstra a composição de cada tipo de amostra e os volumes sugeridos pelo fabricante.

Tabela 5: Amostras utilizadas para análise de colesterol total e volumes indicados pelo fabricante.

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01mL	-----
Padrão (n°2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1	1,0mL	1,0mL	1,0mL

Para calcular as concentrações de colesterol das amostras teste, primeiramente diminuiu-se a absorvância encontrada na amostra Branco de todas as outras amostras, a fim de desconsiderar a contribuição da cor do próprio reagente na hora de quantificar a cor da reação. Descontada a absorvância da amostra Branco, dividiu-se a absorvância de cada uma das amostras teste pela absorvância da amostra padrão e multiplicou-se por 200, como indicado pela figura 6:

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância do Teste}}{\text{Absorvância do Padrão}} \times 200$$

Figura 6: Cálculo do valor de colesterol total a partir da absorvância das amostras.

Para as análises de colesterol total, a redução de escala utilizada foi de 70%. Quando a indicação do fabricante era de utilizar 1000 µl, foi utilizado 300 µl e onde era indicado o uso de 10 µl, foi utilizado 3 µl.

Para as análises de HDL colesterol, o soro passou por um processo de precipitação das frações VLDL e LDL através da adição do precipitante (ácido fosfotungstíco 1,5 mmol/L e cloreto de magnésio) na proporção de 1:1.

Após a adição do reagente precipitante ao soro, o tubo foi vigorosamente agitado por 30 segundos e centrifugado por 15 minutos a 0,5 g e o sobrenadante foi utilizado nas análises como amostra teste.

Para realizar as dosagens de HDL - colesterol foram necessários três tipos diferentes de amostras. A amostra branco, que continha apenas reagente 1 (precipitante); a amostra padrão que continha reagente 1 e reagente padrão (0,52mmol/L de colesterol e azida sódica 14,6mmol/L) e as amostras teste que continham reagente 1 e o sobrenadante da precipitação. As absorvâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro a 500nm. As quantidades sugeridas pelo fabricante são, na amostra Branco, 1 mL de reagente 1, na amostra padrão são 1mL de reagente 1 e 10µl de reagente padrão e nas amostras teste são 1ml de reagente 1 e 10µl de amostra.

A tabela 6 demonstra a composição de cada tipo de amostra e as quantidades sugeridas pelo fabricante.

Tabela 6: Amostras utilizadas para análise de HDL - colesterol e quantidades indicadas pelo fabricante.

	Branco	Teste	Padrão
Sobrenadante	-----	0,01mL	-----
Padrão (n°2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1	1,0mL	1,0mL	1,0mL

Para calcular as concentrações de HDL – colesterol das amostras teste, primeiramente diminui-se a absorvância encontrada na amostra Branco, de todas as outras amostras para que se desconsidere a contribuição da cor do próprio reagente na hora de quantificar a cor da reação. Descontada a absorvância da amostra Branco, dividiu-se a absorvância de cada uma das amostras teste pela absorvância da amostra padrão e multiplicou-se por 40, como indicado pela figura 7.

$$\text{Colesterol HDL (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância do Teste}}{\text{Absorvância do Padrão}} \times 40$$

Figura 7: Cálculo do valor de HDL - colesterol a partir da absorvância das amostras.

Para análise de HDL – colesterol, não foi possível uma redução de escala. O teste só produziu resultados estáveis quando as quantidades utilizadas nas análises foram as indicadas pelo fabricante, conforme a tabela 6.

As análises de LDL – colesterol foram realizadas em duas etapas. Primeiramente, as amostras utilizadas foram teste, que consiste em soro e reagente

1 (tampão pH 6,3, colesterol esterase <1500 U/L, colesterol oxidase <1500 U/L, peroxidase <1300 U/L, 4 aminoantipirina <1,0%, ascorbato oxidase <3000 U/L e surfactante <1,0%); e calibrador que consiste em reagente 1 e calibrador (colesterol LDL humano e azida sódica ≤0,1%). Essas amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 5 minutos e as absorbâncias foram determinadas a 546nm, obtendo-se então o valor A1.

A segunda etapa consiste na adição do reagente 2 (tampão pH6,3, surfactante <1,0% e DSBmT < 1,0mM) em todas as amostras. Após a adição do reagente 2 as amostras foram novamente incubadas a 37°C por mais 5 minutos. Nesta etapa a absorbância é determinada a 546nm e consiste no valor A2.

Antes de realizar os cálculos para obtenção dos valores de LDL- colesterol foinecessário corrigir o valor A1 pelo volume final da reação. O cálculo para o valor de LDL – colesterol esta na figura 8:

$$\text{Colesterol LDL (mg/dL)} = \frac{\text{Teste } (A_2 - A_{1\text{cor}})}{\text{Calibrador } (A_2 - A_{1\text{cor}})} \times \text{CC}$$

Figura 8: Cálculo do valor de LDL - colesterol a partir da absorbância das amostras.

Para análise de LDL - colesterol, a redução de escala utilizada foi de 60%. Quando a indicação do fabricante era de utilizar 10 µl de soro, foi utilizado 4 µl.

Para realizar as dosagens de triglicérides, também foram necessários três tipos diferentes de amostras. A amostra branco, que continha apenas reagente 1 (tampão 50 mmol/L, pH7,0; íons magnésio 4 mmol/L; 4-clorofenol 2,70 mmol/L; 4aminoantipirina 300 µmol/l; ATP 1,8mmol/L; lipoproteína lipase ≥1400 U/L; glicerolquinase ≥1000 U/L; glicerolfosfatooxidase ≥ 1500 U/L; peroxidase ≥ 900 U/L e

azida sódica 0,095%); a amostra padrão que continha reagente 1 e reagente padrão (triglicérides 200mg/dL e azida sódica 0,045%); e as amostras teste que continham reagente 1 e as amostras de soro a serem analisadas. As absorbâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro a 505nm. Os volumes sugeridas pelo fabricante são, na amostra Branco, 1 mL de reagente 1, na amostra padrão são 1mL de reagente 1 e 10µl de reagente padrão e nas amostras teste são 1ml de reagente 1 e 10µl de amostra.

A tabela 7 demonstra a composição de cada tipo de amostra e as quantidades sugeridas pelo fabricante.

Tabela 7: Amostras utilizadas para análise de triglicérides e quantidades indicadas pelo fabricante.

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01mL	-----
Padrão (n°2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1	1,0mL	1,0mL	1,0mL

Para calcular as concentrações de triglicérides das amostras teste, primeiramente diminui-se a absorbância encontrada na amostra branco de todas as outras amostras para que se desconsidere a contribuição da cor do próprio reagente na hora de quantificar a cor da reação. Descontada a absorbância da amostra

Branco, dividiu-se a absorvância de cada uma das amostras teste pela absorvância da amostra padrão e multiplicou-se por 200, como indicado pela figura 9.

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância do Teste}}{\text{Absorvância do Padrão}} \times 200$$

Figura 9: Cálculo do valor de triglicérides a partir da absorvância das amostras.

Para análise de triglicérides, a redução de escala utilizada também foi de 70%. Quando a indicação do fabricante era de utilizar 1000 µl, foi utilizado 300 µl e onde era indicado o uso de 10 µl, foi utilizado 3 µl.

Todos os testes colorimétricos foram lidos em placas de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ao invés de cubetas. As leituras em placa tornaram o processo de preparação e leitura das amostras mais ágil.

6.9 Análise histológica

Para a realização da análise histológica, os peixes foram anestesiados e a retirada do fígado ocorreu em 3 etapas:

- Etapa 1: incisão com microtesoura a partir do ventre do peixe, imediatamente anterior ao ânus. O corte seguia ao longo do abdome em direção ao opérculo - o revestimento rígido sobre as guelras próximo a nadadeira peitoral (Figura 10 etapa 1).

- Etapa 2: do opérculo o corte subia até a parte posterior da cabeça, seguia subjacente a coluna (em direção a nadadeira dorsal) e então descia até a nadadeira anal.

- Etapa 3: O fragmento era retirado com auxílio de pinça de microcirurgia no sentido cabeça-cauda (Figura 10 etapas 2 e 3).

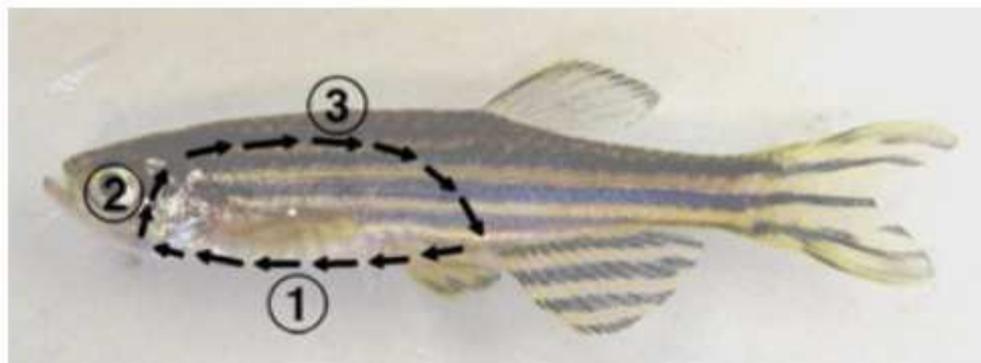


Figura 10: Etapas para retirada do tecido hepático.

Fonte: Adaptado de Kinkel et al, 2010.

As amostras de fígado foram colocadas em formalina (10 % tamponada). Após o processamento histológico padrão, as lâminas foram coradas com Hematoxilina Eosina. Patologistas cegados para os grupos em estudo avaliaram a presença de gordura nos hepatócitos. As imagens foram capturadas em microscópio (Olympus BX51) com aumento de 400 vezes.

A avaliação histológica foi feita por um patologista cegado quanto aos grupos de estudo com principal foco na eventual deposição de lipídeos nos hepatócitos.

6.10 Análise estatística

Para variáveis quantitativas, os dados foram descritos como média e erro padrão.

O teste estatístico utilizado foi o teste *t* de student. Nível de significância foi considerado 5%.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 13.0 e Excel (Windows) versão 2007.

6.11 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com a legislação vigente no Brasil (Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008) que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e a resolução Normativa 04/97 do HCPA que estabelece normas para a utilização de animais em projetos de pesquisa.

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA sendo aprovado (número de processo 10 – 0301).

7 RESULTADOS

O presente estudo utilizou 80 peixes para as análises bioquímicas e 8 peixes para as análises histológicas. Todos os peixes foram pesados e tiveram seu comprimento aferido antes e após o período experimental. Essas análises foram realizadas após 14 dias de experimento em que os peixes foram divididos em dois grupos: um grupo com e outro sem acesso aos próprios ovos.

7.1 Índice de massa corporal

Peso e comprimento dos animais foram medidos antes e depois do período experimental e o índice de massa corporal foi calculado como peso dividido pelo comprimento ao quadrado.

Não houve diferença significativa entre os grupos no início do experimento (com acesso aos ovos: $0,041 \pm 0,002 \text{ g/cm}^2$; sem acesso aos ovos: $0,039 \pm 0,001 \text{ g/cm}^2$, $P= 0,67$), nem no final do experimento (com acesso aos ovos: $0,035 \pm 0,0009 \text{ g/cm}^2$; sem acesso aos ovos: $0,037 \pm 0,0013 \text{ g/cm}^2$, $P=0,49$). O teste estatístico utilizado foi teste t pareado (figura 11)

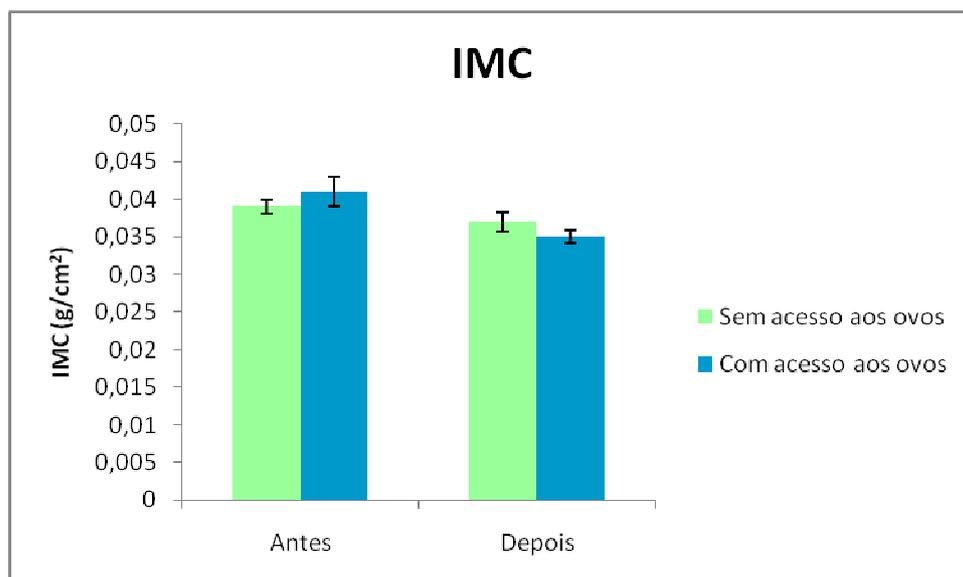


Figura 11: IMC dos peixes antes e duas semanas após o experimento.

7.2 Padronização dos kits colorimétricos

Foi possível realizar uma redução de escala de até 70% nos kits colorimétricos comerciais (tabela 8). As padronizações realizadas com os soros sintéticos obtiveram variações menores de 10% entre si e também em relação ao valor de referência dos soros, fornecido pelo laboratório fabricante. Em relação ao kit colorimétrico para a análise de HDL - colesterol, não foi possível encontrar uma redução de escala que mantivesse a estabilidade e reprodutibilidade dos resultados, por esse motivo, as análises de HDL – colesterol foram realizadas na proporção indicada pelo fabricante.

Tabela 8: Redução de escala padronizada para os testes colorimétricos.

Teste	Quantidade de soro indicada pelo fabricante	Quantidade utilizada	% de Redução
Colesterol Total	10 µl	3 µl	70%
LDL – Colesterol	10 µl	4 µl	60%
Triglicérides	10 µl	3 µl	70%

7.3 Níveis séricos de Colesterol total

Não houve diferença estatisticamente significativa ($P = 0,91$) nos níveis séricos de colesterol total entre o grupo sem acesso aos ovos ($357,69 \pm 13,32$ mg/dL) e o com acesso aos ovos ($362,82 \pm 13,32$). O teste estatístico utilizado para as análises dos níveis de colesterol ,HDL – colesterol, LDL – colesterol e triglicérides foi o teste *t* de student (Figura 12).

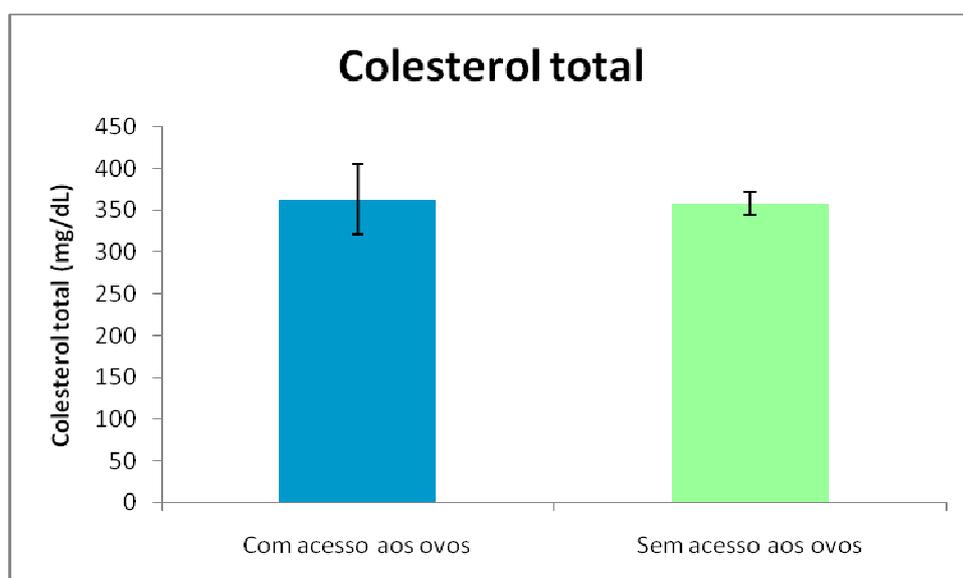


Figura 12: Níveis séricos de colesterol total dos grupos com acesso aos ovos e sem acesso aos ovos. Test *t* de student foi utilizado para a análise estatística dos dados ($P=0,91$).

7.4 Níveis séricos de HDL – colesterol

Quando comparados os níveis séricos de HDL – colesterol, não foi verificada diferença estatisticamente significativa ($P = 0,06$) entre os grupos (com acesso aos ovos $91,22 \pm 1,79$ mg/dL e sem acesso aos ovos $72,14 \pm 2,89$ mg/dL) (Figura 13).

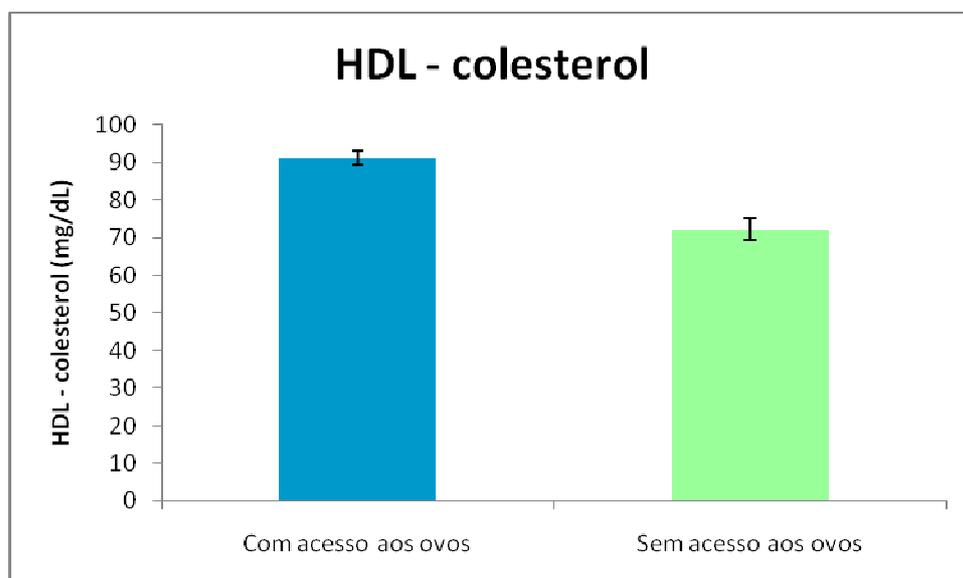


Figura 13: Níveis séricos de HDL - colesterol dos grupos com acesso aos ovos e sem acesso aos ovos. Test *t* de student foi utilizado para a análise estatística dos dados ($P=0,06$).

7.5 Níveis séricos de LDL – colesterol

Os níveis séricos de LDL – colesterol não foram estatisticamente diferentes ($P= 0,46$) entre os grupos com acesso aos ovos ($55,68 \pm 10,88$ mg/dL) e sem acesso aos ovos ($44,18 \pm 9,84$ mg/dL) (Figura 14).

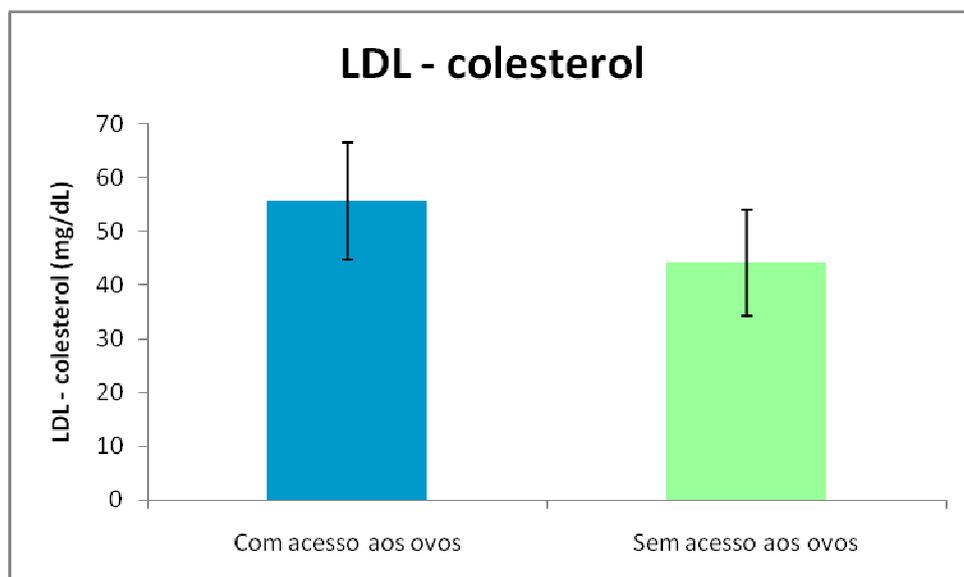


Figura 14: Níveis séricos de LDL – colesterol dos grupos com acesso aos ovos e sem acesso aos ovos. Teste utilizado para análise estatística dos dados teste t student (P=0,46).

7.6 Níveis séricos de triglicérides

Os níveis séricos de triglicérides do grupo sem acesso aos ovos foram estatisticamente menores ($P = 0,03$) quando comparados aos do grupo com acesso aos ovos ($292,36 \pm 64,24$ mg/dL e $457,64 \pm 25,27$ mg/dL respectivamente) (Figura 15).

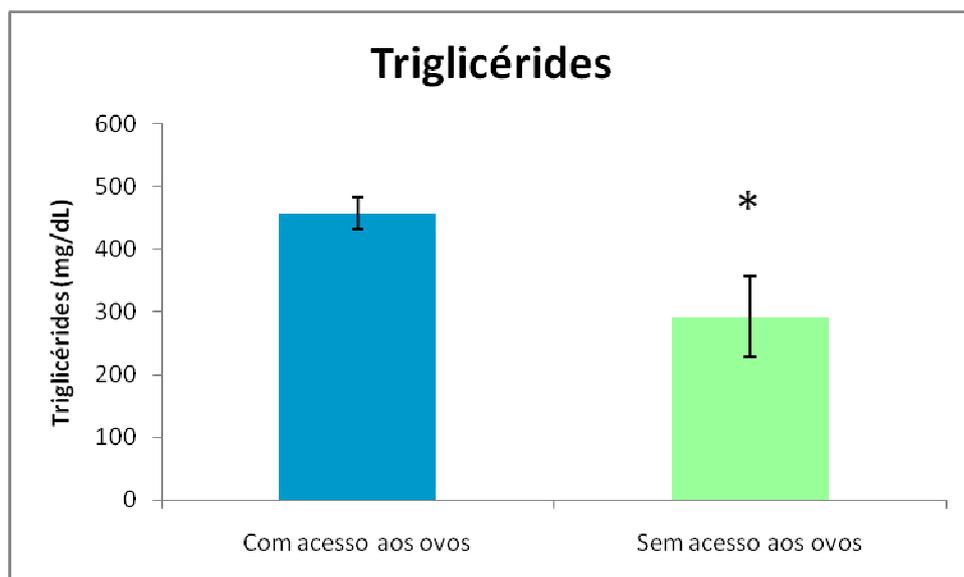


Figura 15: Níveis séricos de triglicérides dos grupos com acesso aos ovos e sem acesso aos ovos. Test *t* de student foi utilizado para a análise estatística dos dados. * P = 0,03

7.7 Análise histológica

Os achados histológicos foram de estrutura preservada. Não foram encontradas evidências de acúmulo de lipídeos à hematoxilina e eosina. Imagens com aumento de 400x (Figura 17).

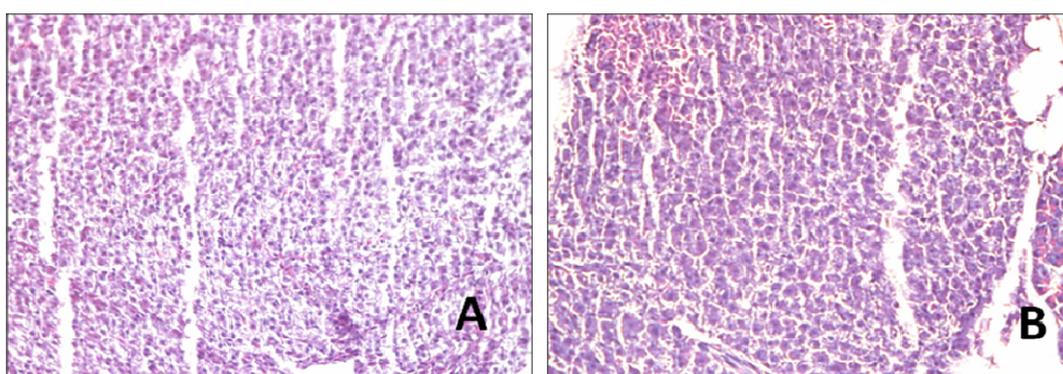


Figura 16: Aspectos microscópicos dos cortes de fígado dos dois grupos. Coloração com hematoxilina e eosina (400x). A) Grupo com acesso aos ovos. B) Grupo sem acesso aos ovos.

8 DISCUSSÃO

O presente estudo se propôs a investigar a interferência do acesso do Zebrafish os próprios ovos no peso corporal, através da aferição do IMC; nos níveis séricos de colesterol e triglicérides, através de testes colorimétricos comerciais padronizados em pequena escala e na avaliação histológica dos hepatócitos, com a hipótese de que a ingestão dos ovos seria capaz de aumentar o perfil lipídico sérico dos peixes, alterar o peso corporal e aumentar a quantidade de gordura presente nos hepatócitos.

8.1 Coleta de sangue

Jagadeeswaran e Sheehan foram os primeiros a descreverem um método de coleta de sangue para Zebrafish em 1999 (Jagadeeswaran, J. P. Sheehan, Craig, & Troyer, 1999). Esse método se consistiu em, primeiramente, romper a pele do Zebrafish com uma tesoura de dissecação, tendo cuidado de evitar o trato gastrintestinal. Uma incisão de 0,3 a 0,5 cm era realizada posterior a nadadeira dorsal, na região da aorta dorsal e o sangue proveniente dessa incisão era coletado com uma ponteira de micropipeta. Os autores mencionaram que, através dessa técnica era possível coletar de 1 a 5 μ l de sangue total de cada peixe. No entanto, Murtha e colaboradores, que utilizaram essa mesma técnica, foram capazes de coletar até 10 μ l de sangue de cada peixe.

Eames e colaboradores, em 2010, descreveram uma maneira diferente de coletar o sangue do Zebrafish. Com esse método, depois de anestesiados, os animais eram decapitados com um corte na cintura peitoral, imediatamente anterior a articulação da nadadeira peitoral, o que resultava em um corte também no

coração. Através de um tubo microcapilarizado, posicionado adjacente ao coração, o sangue foi coletado em uma quantidade média de 5 μ l de cada peixe, mas os autores relataram que coletar 10 μ l de sangue total não foi incomum.

A quantidade de sangue coletada pelo presente estudo foi variável. Quando comparada com Jagadeeswaran (Jagadeeswaran & J P Sheehan, 1999), nosso grupo foi capaz de coletar um volume de sangue 4 vezes maior. Obtendo uma maior quantidade de sangue de cada animal, foi possível utilizar menos peixes para a realização dos experimentos. Comparado com Murtha, que obteve um *n* total de 250 peixes, o presente estudo utilizou 80 peixes para as análises bioquímicas o que significa uma diminuição de 68% na quantidade de peixes utilizados por Murtha.

Após a coleta do sangue, o soro foi obtido através de centrifugação. Nessa etapa, no projeto piloto, foram encontradas algumas dificuldades devido a hemólise de algumas amostras. A publicação de Murtha e colaboradores (Murtha et al., 2003) também mencionou a presença de pequena hemólise nas amostras de soro utilizadas. No estudo desses autores, o soro foi obtido por centrifugação do sangue total por 10 minutos a 0,5 *g*. Os autores observaram que, quando a velocidade de centrifugação era mais alta, o número de amostras hemolisadas era maior. A partir de uma comunicação pessoal de Jill Murtha, foi diminuída a velocidade de centrifugação para 0,5 *g* e reduzido o tempo entre a coleta de sangue e a centrifugação. A partir desses ajustes foi possível eliminar a hemólise das amostras. Eames e colaboradores também mencionaram a ocorrência de hemólise em algumas amostras. No entanto, esses autores associaram a presença de hemólise à manipulação imprópria e ao armazenamento do sangue em temperatura inadequada (Eames et al., 2010).

A utilização de *pools* nas análises bioquímicas foi considerada quase uma imposição, devido às pequenas dimensões do Zebrafish. A vantagem da sua utilização é o fato de que o *pool* representa uma população e não um só indivíduo.

Uma das principais dificuldades de avaliar os valores bioquímicos sanguíneos do Zebrafish é a pequena quantidade de material biológico que é possível obter de cada peixe. O presente estudo também se propôs a desenvolver uma maneira de coletar o sangue do Zebrafish a fim de obter um maior volume. O principal aspecto relacionado à coleta de sangue realizada neste estudo foi a forma de anestesia.

8.2 Anestesia

Os anestésicos metano sulfonato de tricaína (MS-222) a 0,02% em água a 28,5°C foi comparado com água gelada como método anestésico. A anestesia dos animais era feita pela imersão dos peixes nas soluções anestésicas e monitoramento dos sinais de estágios de anestesia, como perda de equilíbrio, perda de movimentos operatórios e perda de reatividade (Eames et al., 2010). O confronto dos níveis de glicemia entre os dois métodos de anestesia foi realizado, pois a associação entre estresse e hiperglicemia também é encontrada em Zebrafish. O resultado do confronto entre os dois métodos anestésicos constatou que os animais submetidos a anestesia por água gelada apresentaram níveis de glicemia mais baixos em comparação aos que receberam anestesia com MS-222.

O estudo de Murtha e colaboradores utilizou MS-222, como método de eutanásia utilizado antes da coleta de sangue. A imersão dos peixes em uma solução de tricaína MS-222 em uma concentração de 0,3% em água fria foi utilizada.

Para o desenvolvimento do presente estudo foi necessário utilizar uma estratégia anestésica que não afetasse o metabolismo hepático do peixe, como ocorre com a tricafina (MS-222). Preservar o metabolismo do peixe era fundamental para que as análises sanguíneas e histológicas pudessem fornecer dados fidedignos. A solução encontrada para a anestesia foi a imersão dos peixes em água do aquário com flocos de gelo, método também indicado como prática veterinária humanizada (Wilson, Bunte, & Carty, 2009). Os peixes foram considerados anestesiados quando não responderam a estímulos externos, o que ocorreu de 3 a 6 segundos após a imersão em água resfriada.

8.3 Utilização do IMC

A divisão da massa pela área corporal é largamente utilizada em humanos para avaliação do estado nutricional. A utilização de índice de massa corporal para Zebrafish é recente e permite a utilização desse peixe para estudos sobre obesidade. Recentemente, isso está sendo realizado no projeto OBELIX - OBesogenic Endocrine disrupting chemicals: LInking prenatal eXposure to the development of obesity later in life.

Conforme já mencionado por Oka e colaboradores (Oka et al., 2010), o IMC do Zebrafish é considerado o peso em gramas dividido pelo comprimento em centímetros quadrados. Os valores de IMC encontrados no presente estudo não apresentaram diferença significativa entre os grupos e foram bastante semelhantes aos publicados em 2010 por Oka e colaboradores, antes da indução de obesidade pela dieta. O modo utilizado para medir o peso e o comprimento dos peixes foi o

mesmo nos dois estudos. A média de IMC encontrada por este estudo foi de 0,030g/cm² enquanto os valores de Oka e colaboradores foram 0,032g/cm².

8.4 Redução da escala dos teste colorimétricos

Para as análises bioquímicas, foram utilizados os testes colorimétricos devido a sua facilidade de execução, pelo baixo custo e porque requerem apenas equipamentos simples. Esse tipo de teste já havia sido utilizado para análise de sangue de Zebrafish anteriormente (Murtha et al., 2003; Oka et al., 2010). No entanto, Murtha e colaboradores utilizaram um equipamento automatizado específico para diagnóstico veterinário, apenas o princípio do método utilizado foi o mesmo.

O fabricante dos kits dos testes utilizados indica nas instruções de uso que os testes poderiam ter sua escala reduzida em até 50%, com a garantia de resultados estáveis, ou seja, o volume de reagentes e de amostra necessários para a realização dos testes poderia ser reduzida a metade. A partir dessa informação procurou-se a menor escala capaz de produzir resultados confiáveis.

8.5 Níveis de lipídeos séricos

Os valores de colesterol total encontrados no grupo que teve acesso aos próprios ovos, no presente estudo, foram cerca de 81% mais altos dos encontrados por Stoletov e colaboradores (Stoletov et al., 2009). A média encontrada por Stoletov foi de 200mg/dL, sem mencionar a respeito do acesso aos ovos, enquanto que, em nosso estudo, o grupo com acesso aos ovos apresentou 362mg/dL de colesterol total. No entanto, níveis mais altos de colesterol total estão de acordo com o

esperado para teleósteos. Segundo Holttä-Vuori, esses peixes apresentam um perfil hipercolesterolêmico quando comparados aos mamíferos.

Os níveis de HDL-colesterol encontrados nos nossos experimentos apresentaram uma média de 81mg/dL entre os grupos com e sem acesso aos ovos, sem diferença significativa entre eles. Os níveis de LDL-colesterol apresentaram uma média de 49mg/dL entre os mesmos grupos, também sem diferença significativa entre eles. Esses dados estão de acordo com Stoletov e Babin (P. Babin, 1989; Stoletov et al., 2009) que demonstraram que a fração de colesterol predominante em peixes teleósteos, incluindo o Zebrafish, é a HDL. Além disso, Holttä-vuori (Hölttä-Vuori et al., 2010) menciona que o perfil sérico de lipoproteínas no Zebrafish é modelado pela dieta. Assim sendo, a ingestão dos ovos pode ser considerada um fator de importante influência no perfil lipídico dos peixes.

A média dos níveis de triglicérides encontrados no grupo com acesso aos ovos, no presente estudo, foi 457mg/dL. Já no grupo sem acesso aos ovos, a média foi de 292mg/dL. No estudo de Oka e colaboradores os níveis plasmáticos foram diferentes entre machos e fêmeas do grupo controle, ao início do experimento. No entanto, esse dado não é discutido no artigo. Machos apresentaram uma média de 100mg/dL de triglicérides plasmáticos, já as fêmeas apresentaram o dobro desse valor (Oka et al., 2010).

O grupo controle do estudo de Stoletov e colaboradores apresentou níveis médios de triglicérides plasmáticos de 100mg/dL, assim como Oka e colaboradores. No entanto, no estudo de Stoletov não foi feita a distinção entre os sexos. (Stoletov et al., 2009). Holttä-vuori e colaboradores mencionam que teleósteos tem níveis de

triglicérides mais altos quando comparado aos mamíferos, assim como níveis de colesterol. (Hölttä-Vuori et al., 2010). Esse perfil vai ao encontro dos achados do presente estudo.

Foi possível observar que os testes colorimétricos padronizados em escala reduzida foram capazes de reproduzir o perfil lipídico típico de teleósteos, ou seja, níveis de colesterol e triglicérides mais altos em comparação aos humanos e a fração HDL do colesterol maior em relação a LDL.

8.6 Análise histológica

Estudos do nosso grupo, já submetidos à publicação, avaliaram o acúmulo de gordura nos hepatócitos, em modelos de esteatose hepática em Zebrafish, através de técnicas histológicas. Esses estudos utilizaram o peixe como modelo de esteatose hepática alcoólica e não-alcoólica. O modelo de esteatose hepática alcoólica foi obtido através de exposição dos peixes a álcool 0,5%, pelo período de 14 dias. A esteatose hepática não-alcoólica no Zebrafish foi induzida através da administração de tioacetamida durante quatro semanas. Nesses modelos, o acúmulo de gordura nos hepatócitos do Zebrafish apresentou um padrão homólogo ao padrão encontrado em mamíferos. No presente estudo não foi observado acúmulo de gordura nos hepatócitos, demonstrando que o acesso aos próprios ovos não foi capaz de gerar acúmulo de gordura, avaliado através de coloração hematoxilina e eosina, ainda que os níveis de triglicérides tenham sido aumentados.

8.7 Considerações finais

A comparação e discussão dos resultados encontrados nas análises bioquímicas do sangue de Zebrafish são limitadas, devido ao reduzido número de publicações a esse respeito. A escassez de estudos nessa área pode estar relacionada às dificuldades com as técnicas de coleta de sangue até então disponíveis e a facilidade de hemólise das amostras de sangue.

Estudos sobre os nutrientes presentes nos ovos de Zebrafish foram ainda mais raros. As publicações a respeito de ovos de Zebrafish são relacionadas a estratégias de reprodução e não aos constituintes nutricionais dos ovos. O hábito de ingerir os próprios ovos é uma característica dos teleósteos (Brook, S.; Tyler, C.R.; Sumper, J.P., 1997). A mobilização de proteínas corporais é aumentada na produção dos ovos. A ingestão dos ovos parece ser uma estratégia do animal para repor as proteínas utilizadas na formação dos ovos. Não foi encontrada na literatura uma técnica para monitoramento da ingestão dos ovos pelos peixes nem a quantidade de ovos que são ingeridos. A esse respeito são apenas mencionadas técnicas que impedem o acesso aos ovos, como a utilizada neste estudo. Por esse motivo, a principal limitação deste estudo é justamente a possibilidade de garantir apenas o controle do acesso aos ovos, sem a garantia da ingestão pelos peixes.

Os resultados encontrados no presente estudo foram intrigantes. Por que o acesso dos peixes aos próprios ovos foi capaz de alterar apenas os níveis de triglicérides? A fim de responder a essa questão, foi realizada uma tentativa de dosagem de triglicérides nos ovos dos peixes. 50mg de ovos retirados do abdôme de Zebrafish fêmeas, que tiveram livre acesso aos ovos, foram macerados e

centrifugados por 20 minutos a 0,5 g. O sobrenadante foi utilizado na dosagem de triglicérides através de teste colorimétrico. Em um n de três, o valor médio encontrado foi 358mg/dL. No entanto, esse dado é de difícil comparação visto que, como já mencionado, não foram encontrados dados a respeito da composição nutricional dos ovos de Zebrafish. Além disso, parece haver um ciclo entre a ingestão e a composição nutricional dos ovos. Os lipídeos presentes nos ovos são provenientes do plasma sanguíneo e a proporção das lipoproteínas é modulada pela dieta. Uma vez que os ovos fazem parte da dieta do Zebrafish, cria-se uma relação de causa e efeito sobre a composição do próprio ovo.

Além da tentativa de quantificação dos triglicérides dos ovos, uma hipótese foi gerada a fim de esclarecer os resultados encontrados. Devido a grande similaridade entre o metabolismo dos lipídeos do Zebrafish e dos mamíferos, é possível que o nutriente capaz de alterar os níveis de triglicérides nos mamíferos seja capaz de também alterar em Zebrafish. Sendo assim, é possível que os ovos de Zebrafish sejam ricos em carboidratos e, quando ingeridos, são capazes de influenciar os níveis séricos de triglicérides, sem alterar os de colesterol.

Ainda na tentativa de esclarecer os resultados encontrados, a glicemia dos animais foi aferida. Logo após a coleta de sangue para as análises bioquímicas, o sangue remanescente na incisão realizada para a coleta foi aproximado de uma fita de hemoglicose teste e as análises foram realizadas como descrito por Eames e colaboradores (Eames et al., 2010). Os valores encontrados não apresentaram diferença significativa entre os grupos ($46,00 \pm 4,90$ no grupo com acesso aos ovos e $57,28 \pm 4,78$ no grupo sem acesso aos ovos, $P=0,12$, $n = 7$). Esses resultados levam a pensar que restringir o acesso aos ovos durante duas semanas não foi

capaz de influenciar na glicemia de jejum, ainda que tenha influenciado nos níveis de triglicérides, e que o principal nutriente presente nos ovos poderia não seja o carboidrato, visto que não houve influência na glicemia de jejum.

Considerando que a composição nutricional dos ovos de Zebrafish não está esclarecida, procurou-se a composição dos ovos de espécies próximas ao Zebrafish, para comparações. Assim, a composição dos ovos de esturjão (*Acipenser oxyrinchus*), que são consumidos como caviar, foi encontrada. Nesses ovos, o nutriente presente em maior quantidade é a proteína (24,6%), seguida de lipídeos (17,9%) e em menor quantidade os carboidratos (4%) (U.S. Department of Agriculture, 2010). Se a composição nutricional dos ovos de Zebrafish for similar a dos ovos de esturjão, os níveis elevados de triglicérides séricos, do grupo com acesso aos ovos, não poderiam ser explicados pelo alto teor de carboidrato dos ovos, pois o principal nutriente dos ovos seria a proteína. Nesse caso, os níveis de triglicérides poderiam estar relacionado ao metabolismo de carboidratos ser diferente no Zebrafish em comparação aos mamíferos.

Para o nosso conhecimento, é a primeira vez que o efeito do acesso aos ovos de Zebrafish é estudado. Visto que estudos sobre o metabolismo lipídico estão sendo incentivados em Zebrafish, o controle do acesso aos ovos é um aspecto importante e que deve ser considerado durante a experimentação.

9 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

- 1) Quanto a coleta de sangue
 - a. Foi possível coletar até quatro vezes mais sangue, com a nova técnica utilizada, quando comparado com as técnicas precedentes.
- 2) Quanto a utilização dos testes colorimétricos
 - a. As padronizações das reduções de escala foram de até 70% nos testes utilizados.
 - b. Foi possível analisar os níveis séricos de colesterol total, HDL – colesterol, LDL - colesterol e triglicérides no Zebrafish através de testes colorimétricos comerciais.
- 3) Quanto à análise histológica
 - a. Não foi encontrado acúmulo de gordura nos hepatócitos corados com hematoxilina e eosina.
- 4) Quanto ao acesso aos ovos
 - a. O acesso aos ovos não gerou o acúmulo de gordura nos hepatócitos em hematoxilina e eosina, nem influenciou no IMC dos peixes, assim como não alterou os níveis séricos de colesterol total, HDL – colesterol e LDL – colesterol. No entanto, permitir o acesso do Zebrafish aos próprios ovos durante 14 dias fez com que os níveis séricos de triglicérides fossem maiores em relação ao grupo que não teve acesso.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, J. L., Carten, J. D., & Farber, S. a. (2011). Zebrafish lipid metabolism: from mediating early patterning to the metabolism of dietary fat and cholesterol. *Methods in cell biology*, *101*, 111-41.
- Andriguetto, J. M. (2002). *Nutrição Animal. As bases e os fundamentos da nutrição animal*. São Paulo: Editora Nobel.
- Babin, P. (1989). Plasma lipoproteins in fish. *Journal of Lipid Research*, *30*, 467-490.
- Babin, P J, Thisse, C, Durliat, M., Andre, M., Akimenko, M. a, & Thisse, B. (1997). 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*, *94*(16), 8622-7.
- Best, J. D., & Alderton, W. K. (2008). Zebrafish: An in vivo model for the study of neurological diseases. *Neuropsychiatric disease and treatment*, *4*(3), 567-76.
- Biga, P. R., Goetz, F W, Medeiros, E. F., Phelps, M. P., Fuentes, F. D., Bradley, T. M., Johnston, I. A., et al. (2006). Zebrafish and giant danio as models for muscle growth□: determinate vs . indeterminate growth as determined by morphometric analysis Zebrafish and giant danio as models for muscle growth□: determinate vs . indeterminate growth as determined by morphometri. *American Journal Of Physiology*, *291*, 1327-1337.
- Bownes, M. (1992). Why is there sequence similarity between insect yolk proteins and vertebrate lipases? *Journal Of Lipid Research*, *33*, 777-790.
- Brooks, S., Tyler, Charles R., & Sumpter, John P. (1997). Egg quality in fish□: what makes a good egg□? *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, *7*, 387-416.
- Childs, S., Weinstein, B. M., Mohideen, M.-ali P. K., Donohue, S., Bonkovsky, H., & Fishman, M. C. (2000). Zebrafish dracula encodes ferrochelatase and its mutation provides a model for erythropoietic protoporphyria. *Current Biology*, *10*(16), 1001-1004.
- Davail, B., Pakdel, F., Bujo, H., Perazzolo, L. M., Waclawek, M., Schneider, W. J., & Le Menn, F. (1998). Evolution of oogenesis: the receptor for vitellogenin from the rainbow trout. *Journal of lipid research*, *39*(10), 1929-37.
- Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S. J., Moynihan, J., Paw, B. H., et al. (2000). Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, *403*, 776 - 781.
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, a F., Neuhauss, S. C., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., et al. (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, *123*, 37-46.

- Eames, S. C., Philipson, L. H., Prince, V. E., & Kinkel, M. D. (2010). Blood sugar measurement in zebrafish reveals dynamics of glucose homeostasis. *Zebrafish*, 7(2), 205-13.
- Eastman Kodak Company. (1993). *Veterinary Reference Guideline*. Rochester, NY.
- Ellis, A. E. (2001). *Fish Pathology*. (., Ed.) (3rd ed., pp. 133-150). Philadelphia, USA: Saunders, W. B.
- Elsalini, O. A., & Rohr, K. B. (2003). Phenylthiourea disrupts thyroid function in developing zebrafish. *Development Genes and Evolution*, 212, 593-598.
- Fleming, R. E., & Sly, W. S. (2001). Ferroportin mutation in autosomal dominant hemochromatosis: loss of function , gain in understanding. *Journal of Clinical Investigation*, 108(4), 521 - 522.
- Flynn, E. J., Trent, C. M., & Rawls, J. F. (2009). Ontogeny and nutritional control of adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of lipid research*, 50(8), 1641-52.
- Di Giulio, R. T., & Hinton, D. E. (2008). *The Toxicology of Fishes* (1st ed.). CRC Press.
- Goldsmith, M. I., Iovine, M. K., Reilly-pol, T. O., & Johnson, S. L. (2006). A developmental transition in growth control during zebrafish caudal fin development. *Developmental Biology*, 296, 450 - 457.
- Guyon, J. R., Steffen, L. S., Howell, M. H., Pusack, T. J., Lawrence, C., & Kunkel, L. M. (2007). Modeling human muscle disease in zebrafish. *Biochimica et biophysica acta*, 1772(2), 205-15.
- Hu, N., Yost, H. J., & Clark, E. B. (2001). Cardiac morphology and blood pressure in the adult zebrafish. *The Anatomical record*, 264(1), 1-12.
- Hölttä-Vuori, M., Salo, V. T. V., Nyberg, L., Brackmann, C., Enejder, A., Panula, P., & Ikonen, E. (2010). Zebrafish: gaining popularity in lipid research. *The Biochemical journal*, 429(2), 235-42.
- Jagadeeswaran, P., & Sheehan, J P. (1999). Analysis of blood coagulation in the zebrafish. *Blood cells, molecules & diseases*, 25(3-4), 239-49.
- Jagadeeswaran, P., Sheehan, J. P., Craig, F. E., & Troyer, D. (1999). Identification and characterization of zebrafish thrombocytes. *British Journal of Haematology*, 107(4), 731-738.
- Kaushik, S., Georga, I., & Koumoundouros, G. (2011). Growth and Body Composition of Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae Fed a Compound Feed from First Feeding Onward: *Zebrafish*, 8(2), 87 - 95.

- Lam, S. H., Sin, Y. M., Gong, Z., & Lam, T. J. (2005). Effects of thyroid hormone on the development of immune system in zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, 142, 325-335.
- Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature reviews. Genetics*, 8(5), 353-67.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., & Cerdà, J. (2010). Oogenesis in teleosts: how eggs are formed. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 367-89. Elsevier Inc.
- Luckenbach, J. a, Iliev, D. B., Goetz, Frederick W, & Swanson, P. (2008). Identification of differentially expressed ovarian genes during primary and early secondary oocyte growth in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Reproductive biology and endocrinology*: *RB&E*, 6, 2.
- Marza, E., Barthe, C., André, M., Villeneuve, L., Hérou, C., & Babin, Patrick J. (2005). Developmental expression and nutritional regulation of a zebrafish gene homologous to mammalian microsomal triglyceride transfer protein large subunit. *Developmental dynamics*: *an official publication of the American Association of Anatomists*, 232(2), 506-18.
- Mayden, R. L., Tang, K. L., Conway, K. W., Agnew, M., Bufalino, A., Sulaiman, Z., & Miya, M. (2007). Phylogenetic Relationships of *Danio* Within the Order Cypriniformes: A Framework for Comparative and Evolutionary Studies of a Model Species, 654(April), 642-654.
- Menke, A. L., Spitsbergen, J. M., Wolterbeek, A. P. M., & Woutersen, R. a. (2011). Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. *Toxicologic pathology*, 000(June), 1 - 16.
- Modig, C., Modesto, T., Canario, A., Cerdà, J., von Hofsten, J., & Olsson, P.-E. (2006). Molecular characterization and expression pattern of zona pellucida proteins in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biology of reproduction*, 75(5), 717-25.
- Murtha, J. M., Qi, W., & Keller, E. T. (2003). Hematologic and serum biochemical values for zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative medicine*, 53(1), 37-41.
- Nagel, R. (1993). *Fish - Ecotoxicology and Ecophysiology* (pp. 147 - 156). Weinheim, Germany: VCH.
- Oka, T., Nishimura, Y., Zang, L., Hirano, M., Shimada, Y., Wang, Z., Umemoto, N., et al. (2010). Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. *BMC physiology*, 10, 1 - 13.
- Paik, J., Vogel, S., Quadro, L., Piantedosi, R., Gottesman, M., Lai, K., Hamberger, L., et al. (2004). Vitamin A: Overlapping Delivery Pathways to Tissues from the Circulation 1 , 2. *Medicine*, 276-280.

- Parng, C., Seng, W. L., Semino, C., & McGrath, P. (2002). Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay and drug development technologies*, 1(1 Pt 1), 41-8.
- Prat, F., Coward, K., Sumpter, J P, & Tyler, C R. (1998). Molecular characterization and expression of two ovarian lipoprotein receptors in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biology of reproduction*, 58(5), 1146-53.
- Roberts, R. J., & Ellis, A. E. (2001). *Fish Pathology* (3rd ed., pp. 12-54). Philadelphia, USA: Saunders, W. B.
- Rosemberg, D. B., Rico, E. P., Senger, M. R., Dias, R. D., Bogo, M. R., Bonan, C. D., & Souza, D. O. (2008). Kinetic characterization of adenosine deaminase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 151(1), 96-101.
- Schlegel, A., & Stainier, D. Y. R. (2007). Lessons from “lower” organisms: what worms, flies, and zebrafish can teach us about human energy metabolism. *PLoS genetics*, 3(11), 2037 - 2048.
- Sharma, M. K., Denovan-Wright, E. M., Degrave, A., Thisse, Christine, Thisse, Bernard, & Wright, J. M. (2004). Sequence, linkage mapping and early developmental expression of the intestinal-type fatty acid-binding protein gene (*fabp2*) from zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 138(4), 391-8.
- Sheridan, M. A. (1988). Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comp Biochem Physiol B*, 90(4), 679-690.
- Sire, M. F., Lutton, C., & Vernier, J. M. (1981). New views on intestinal absorption of lipids in teleostean fishes: an ultrastructural and biochemical study in the rainbow trout. *Journal of lipid research*, 22(1), 81-94.
- Skinner, E. R., & Rogie, A. (1978). The isolation and partial characterization of the serum lipoproteins and apolipoproteins of the rainbow trout. *The Biochemical journal*, 173(2), 507-20.
- Song, Y., & Cone, R. D. (2007). Creation of a genetic model of obesity in a teleost. *The FASEB journal*: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 21(9), 2042 - 2049.
- Stoletov, K., Fang, L., Choi, S.-H., Hartvigsen, K., Hansen, L. F., Hall, C., Pattison, J., et al. (2009). Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish. *Circulation research*, 104(8), 952-60.
- Tao, T., & Peng, J. (2009). Liver development in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Genetics and Genomics*, 36(6), 325-334. Institute of Genetics and Developmental Biology and the Genetics Society of China.

- Thorpe, J. L., Doitsidou, M., Ho, S.-Y., Raz, E., & Farber, S. a. (2004). Germ cell migration in zebrafish is dependent on HMGCoA reductase activity and prenylation. *Developmental cell*, 6(2), 295-302.
- U.S. Department of Agriculture, A. R. S. (2010). USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Retrieved from Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>
- Wallace, K. N., Akhter, S., Smith, E. M., Lorent, K., & Pack, M. (2005). Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mechanisms of development*, 122(2), 157-73.
- Wang, H., Long, Q., Marty, S. D., Sassa, S., & Lin, S. (1998). A zebrafish model for hepatoerythropoietic porphyria. *New York*, 20, 239-243.
- Westerfield, M. (1994). *The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of the zebrafish (Danio rerio)*. University of Oregon Press.
- Willard, M. D., Tvedten, H., & Turnwald, G. H. (1989). *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods* (3rd ed., pp. 147 - 218). Philadelphia, USA: Saunders.
- Wilson, J. M., Bunte, R. M., & Carty, A. J. (2009). Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*: *JAALAS*, 48(6), 785- 789.
- Zon, L. I., & Peterson, R. T. (2005). In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nature reviews. Drug discovery*, 4(1), 35-44.

11 ANEXOS

Dados Brutos

Padronização dos Kits

Colesterol total (3µl de amostra de soro sintético)

Amostra	Colesterol (mg/dL)
Soro sintético normal 1	81,34
Soro sintético normal 2	83,41
Soro sintético normal 3	82,77
Soro sintético patológico 1	218,99
Soro sintético patológico 2	223,87
Soro sintético patológico 3	222,84

LDL – colesterol (4µl de soro sintético)

Amostra	Colesterol (mg/dL)
Soro sintético normal 1	148,56
Soro sintético normal 2	148,65
Soro sintético normal 3	146,98
Soro sintético patológico 1	197,84
Soro sintético patológico 2	196,74
Soro sintético patológico 3	195,43

Triglicérides (3µl de soro sintético)

Amostra	Colesterol (mg/dL)
Soro sintético normal 1	108,67
Soro sintético normal 2	109,54
Soro sintético normal 3	111,33
Soro sintético patológico 1	175,55
Soro sintético patológico 2	173,78

Soro sintético patológico 3	173,12
-----------------------------	--------

Resultados do IMC (g/cm²)

Com acesso Antes	Com acesso depois	Sem acesso antes	Com acesso depois
0,004	0,038	0,027	0,028
0,064	0,037	0,028	0,048
0,041	0,039	0,043	0,031
0,052	0,032	0,041	0,023
0,045	0,046	0,046	0,039
0,035	0,026	0,037	0,036
0,072	0,036	0,031	0,027
0,053	0,027	0,043	0,048
0,049	0,033	0,043	0,037
0,041	0,029	0,043	0,021
0,051	0,031	0,038	0,034
0,061	0,038	0,029	0,027
0,071	0,047	0,055	0,035
0,074	0,036	0,042	0,036
0,035	0,033	0,041	0,036
0,038	0,059	0,036	0,047
0,035	0,03	0,037	0,039
0,027	0,056	0,038	0,039
0,018	0,029	0,047	0,02
0,032	0,039	0,058	0,028
0,031	0,03	0,033	0,026
0,022	0,047	0,038	0,031
0,054	0,028	0,038	0,026
0,028	0,031	0,033	0,03
0,032	0,026	0,033	0,041
0,093	0,028	0,036	0,024
0,056	0,022	0,058	0,029
0,048	0,026	0,024	0,029
0,033	0,037	0,041	0,046
0,021	0,04	0,051	0,033
0,028	0,034	0,03	0,029
0,039	0,035	0,037	0,039
0,037	0,04	0,034	0,031
0,037	0,029	0,032	0,031
0,031	0,018	0,03	0,031
0,025	0,038	0,029	0,039
0,036	0,045	0,038	0,037
0,092	0,026	0,05	0,04
0,048	0,058	0,039	0,036
0,04	0,033	0,031	0,03
0,019	0,02	0,038	0,027
0,023	0,044	0,049	0,028

0,027	0,03	0,057	0,033
0,032	0,042	0,039	0,031
0,036	0,046	0,046	0,033
0,046	0,027	0,046	0,032
0,018	0,038	0,027	0,029
0,028	0,035	0,041	0,032
0,029		0,032	
0,05		0,04	
0,045		0,046	
0,035		0,036	
0,035		0,044	
0,037		0,04	
0,042		0,029	

Glicemia (mg/dL)

Com acesso aos ovos	Sem acesso aos ovos	
40	60	
60	43	
66	43	
38	80	
39	61	
30	54	
49	60	
46	57,28571	média
4,9	4,78	ep

Resultados de Colesterol total (mg/dL)

	Com acesso aos ovos	Sem acesso aos ovos
	437,18	357,69
	291,03	380,77
	360,26	334,62
Média	362,82	357,69
dp	73,11	23,08
EP	42,21046	13,32347

Resultados de HDL – colesterol (mg/dL)

	Com acesso aos ovos	Sem acesso aos ovos
	103,96	51,94
	86,89	73,34
	83,91	80,21

	90,14	83,10
média	91,22	72,14
DP	3,11	5,01
EP	1,79	2,89

Resultados LDL- colesterol (mg/dL)

	Com acesso aos ovos	sem acesso aos ovos
	82,34	20,07
	49,37	27,40
	47,07	50,73
	43,95	78,54
Média	55,68	44,18
DP	18,84	17,05
EP	10,88	9,84

Resultados Triglicérides (mg/dL)

	Com acesso aos ovos	sem acesso aos ovos
	509,72	377,78
	477,78	130,56
	425,00	311,11
	418,06	350,00
Media	457,64	292,36
DP	43,78	111,28
EP	25,2771	64,24852

Submissão do artigo



Gabriela Pedroso <glimapedroso@gmail.com>

Submission 3865

Zhao Chen <zhao.chen@jove.com>

Mon, Aug 29, 2011 at 9:32 PM

To: Gabriela Pedroso <glimapedroso@gmail.com>

Hello Dr. Pedroso,
Sorry that I sent the following email to Dr. da Silveira this morning. Yes, we have received your submission.

Hello Dr. da Silveira,
Thank you for your submission (# 3865) to JoVE. Since your submission of #3836 and #3864 are duplicate of #3856, we will track #3865 from now on. If you need to upload any new files, please add them to #3865 account. Thank you!

Your submitted files are currently under our internal quality check and we will get back to you shortly.

Thanks and talk to you soon,
Zhao

—
Zhao Chen, Ph.D.
Science Editor
Journal of Visualized Experiments - JoVE, www.jove.com
48 Grove Street, Somerville, MA 02144

Artigo

Além da parte escrita, este artigo também acompanha um vídeo. Esse vídeo pode ser encontrado no CD da última página desta dissertação.

Title

Blood collection technique and biochemical analysis in Zebrafish (*Danio rerio*)

Authors

Gabriela L. Pedroso¹⁻², Thais O. Hammes¹⁻², Thayssa D.C. Escobar¹, Laisa B. Fracasso¹, Luiz Felipe Forgiarini¹, Themis R. da Silveira¹⁻²

¹ Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Centro de Pesquisa Experimental
Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. Porto Alegre, RS, Brasil. Programa de Pós Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. Porto Alegre, RS, Brasil

Emails

glimapedroso@gmail.com

thaisortizhammes@gmail.com

thatha.90@hotmail.com

laisabeduschi@hotmail.com

felipeforgiarini@gmail.com

themis.silveira@gmail.com

Corresponding author: Gabriela L. Pedroso

Keywords:

Zebrafish, Zebrafish blood, Hematologic, Biochemical analysis

Short abstract:

This paper presents a technique for collection of blood from the dorsal aorta of Zebrafish. It also provides instructions for obtaining serum for use in biochemical analyses, such as tests for determining cholesterol and triglyceride levels.

Long abstract:

The zebrafish has been used as an animal model for studies of several human diseases. It can serve as a powerful preclinical platform for studies of molecular events and therapeutic strategies as well as for evaluating the physiological mechanisms of some pathologies⁽¹⁾.

There are relatively few publications related to zebrafish organs and systems⁽²⁾, which may lead researchers to infer that the basic techniques needed to

allow the exploration of zebrafish systems are lacking⁽³⁾. Hematologic biochemical values of zebrafish were first reported in 2003 by Murtha and colleagues⁽⁴⁾ who employed a blood collection technique first described by Jagadeeswaran and colleagues in 1999. Briefly, blood was collected via a micropipette tip through a lateral incision, approximately 0.3 cm in length, in the region of the dorsal aorta⁽⁵⁾. Because of the minute dimensions involved, this is a high-precision technique requiring a highly skilled practitioner. The same technique was used by the same group in another publication in that same year⁽⁶⁾. In 2010, Eames and colleagues accessed whole blood glucose levels in zebrafish⁽⁷⁾. They gained access to the blood by performing decapitations with scissors and then inserting a heparinized microcapillary collection tube into the pectoral articulation. They mention difficulties with hemolysis that were solved with an appropriate storage temperature based on the work Kilpatrick et al.⁽⁸⁾. When attempting to use Jagadeeswaran's technique in our laboratory, we found that it was difficult to make the incision in precisely the right place as not to allow a significant amount of blood to be lost before collection could be started.

Recently, Gupta et al.⁽⁹⁾ described how to dissect adult zebrafish organs, Kinkle et al.⁽¹⁰⁾ described how to perform intraperitoneal injections, and Pugach et al.⁽¹¹⁾ described how to perform retro-orbital injections. However, more work is needed to more fully explore basic techniques for research in zebrafish.

The small size of zebrafish presents challenges for researchers using it as an experimental model. Furthermore, given this smallness of scale, it is important that simple techniques are developed to enable researchers to explore the advantages of the zebrafish model.

Protocol text:

1. Before collecting zebrafish blood, it is necessary to prepare anesthetizing water. Pour ~200 mL of aquarium water into a container with a 500-mL capacity. Add ~200 g of ice chips. The temperature should be about 4°C. As the ice chips melt, it will be necessary to add more ice chips to maintain a constant temperature near 4°C.
2. When the anesthetizing water is ready, prepare the materials needed for blood collection. Put a low-retention tip on a P20 pipettor and leave the pipettor where it can be easily accessed. Do not allow the pipet tip to contact any sources of contamination.
3. Cover a Petri dish with a piece of dry gauze. A steel blade and another piece of gauze should be placed in an easily accessible place.
4. A centrifuge adapted for plastic tubes will be needed.
5. When the aforementioned materials are prepared, capture the first zebrafish to be anesthetized with a fishing net and release it into the water that has been prepared for anesthesia. Zebrafish require 3–6 s in chilled water to be anesthetized, depending on the fish. Keep the fish in the cold water until it no longer responds to external stimuli.
6. Using the fishing net, place the anesthetized fish on a prepared piece of gauze, leaving the tail off of the gauze. Fold the gauze over the fish's head and body leaving out only its tail. Put the fish covered with the gauze on the Petri dish.
7. Use the steel blade to make a diagonal incision just between the the anal fin and the caudal fin. The blood will start to come out. At this point, it is necessary to work quickly.
8. Gently aspire the blood that comes out with the P20 pipettor (pre-loaded with a low retention tip). The amount of blood that can be collected depends on the size of the fish and to what extent that it was anesthetized correctly. It usually varies from 5 to 20 μ l. When the blood stops coming out, gently transfer the aspirated blood into a tube.
9. To avoid hemolysis, it is critical that the tube with blood in it be handled very carefully, without any drastic movements until it is placed into the centrifuge.
10. To avoid hemolysis, it is also important that the blood sample be secured in the centrifuge within 10 minutes of blood collection.
11. If necessary, it is possible to combine blood from more than one animal, making a *pool*. Pooled samples will work fine as long as the delay between blood collection from the first fish and centrifugation does not exceed 10 minutes.
12. When the blood collection is done, centrifuge the blood for 10 minutes at 0,5 g

(Eppendorf Centrifuge 5415D).

13. Following centrifugation, the serum is at the top layer of the tube. With a pipette, aspirate the serum, making sure to get just the serum while keeping both layers well divided and stable.
14. Transfer the serum into a new microtube and it is ready to be used in biochemical analyses.
15. If the serum will not be used immediately, it can be frozen at -18°C for up to approximately 3 months.

Representative results:

Biochemical analysis of total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, and triglycerides were performed after blood collection using this technique. Two groups of fish were fasted for 24 hours before blood collection to avoid food intake interference. The analyses were done with small-scaled colorimetric tests (Labtest Diagnóstica S.A., Brazil) For total cholesterol and triglyceride analyses, 3 μl of serum were used. For LDL-cholesterol and HDL-cholesterol analysis, 4 μl and 10 μl of serum were used, respectively. These analyses were performed on pooled samples of 10 zebrafish per sample.

Serum lipidic levels were compared between fish that accessed their own eggs and those that, in a bottom covered aquarium, did not have access to their own eggs for an experimental duration of 2 weeks. Serum analysis showed that the serum levels of total cholesterol (with eggs 362 ± 42 mg/dL and without eggs 357 ± 13 mg/dL), HDL-cholesterol (with eggs 91.22 ± 1.79 mg/dL and without eggs 72.14 ± 2.89 mg/dL), and LDL-cholesterol (with eggs 55.68 ± 10.88 mg/dL and without eggs 44.18 ± 9.84 mg/dL) did not differ significantly between the groups. However,

triglyceride levels were significantly lower in the experimental group (without eggs 292 ± 64 mg/dL) than in the control group (with eggs 457 ± 25 mg/dL; $P = 0.03$).

Tables and figures:

	With access to eggs	Without access to eggs
Total Cholesterol (mg/dL)	362.82 ± 42.21	357.69 ± 13.32
LDL – Cholesterol (mg/dL)	55.69 ± 10.88	44.19 ± 9.84
HDL – Cholesterol (mg/dL)	91.23 ± 1.79	72.14 ± 2.89
Triglycerides (mg/dL)	$457.64 \pm 25.27^*$	292.36 ± 64.24

Table 1: With access to eggs and without access to eggs groups cholesterol and triglycerides values expressed in mean \pm standard error.

*Statistically significant ($P=0.03$)

Discussion:

This paper presents a simple technique that allows further blood and serum analysis in zebrafish experiments. This technique has the potential to contribute to future zebrafish hematologic studies requiring blood parameter data. It should also allow for greater applications of the zebrafish as an experimental model.

This technique does not require special skills or implementation of a precise technique. Moreover, it enables up double the amount of blood to be collected relative to other techniques, thereby allowing for the use of fewer fish to obtain the needed amount of biological material. The technique has one critical step, which is

that the blood samples be handled carefully as zebrafish blood can incur hemolysis very easily. The time delay between blood collection and centrifugation must be strictly limited. A 10-minute limit should prevent hemolysis, but, if the serum becomes hemolytic, the time between blood collection and centrifugation can be reduced. The speed of centrifugation can also be decreased to help avoid hemolysis. While the centrifugation can be slowed to a speed that still allows an efficient serum separation, it is important that the time of centrifugation not be increased.

Other blood collection techniques were attempted before this technique was developed. However, the number of animals used was large and very small amounts of blood were collected from each fish. This new technique allowed the use of fewer animals, was demonstrated to be feasible with low skill level practitioners, and gave better results than other techniques in terms of the amount of blood collected from each fish.

Acknowledgments:

FIPE/HCPA - Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Disclosures:

I have nothing to disclose

Table of specific reagents and equipments:

Name of the reagent	Company	Catalogue number	Comments (optional)
Low retention tips	Applied Biosystems	022493020	
Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf	Discontinued	

References:

- Schneider, A.C.R., dos Santo, J.L., Porawski, M., Schaefer, P.G., Maurer, R.L., Matte, U. & da Silveira, T.R. - Implementação de um novo modelo de experimentação animal – *Zebrafish*. Rev. HCPA. 29, 100-103 (2009).
- Briggs, J.P. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. 282, 3-9 (2002).
- Menke, A.L., Sptsbergen, J.M., Wolterbeek, A.P.M., Woutersen, R.A. Normal anatomy and histology of adult Zebrafish. Toxicologic Pathology. 000, 1-16 (2011).
- Murtha, J.M., Qi,W & Keller,E.T. Hematologic and serum biochemical values for Zebrafish. Comp. Med. 53, 37-41 (2003).
- Jagadeeswaran, P., Sheehan, J.P., Craig, F.E. & Troyer, D. Identification and characterization of zebrafish thrombocytes. Br. J. Haematol. 107, 731-738 (1999).
- Jagadeeswaran, P. & Sheehan, J.P. Analysis of blood coagulation in the zebrafish. Blood Cells Mol. Dis. 25, 239-249 (1999).
- Eames, S.C., Philipson, L.H., Prince, V.E. & Kinkel, M.D. Blood sugar measurement in zebrafish reveals dynamics of glucose homeostasis. Zebrafish. 7, 205-213 (2010).
- Kilpatrick, E.S., Rumley, A.G., Rumley, C.N. The effect of haemolysis on blood glucose meter measurement. Diabet. Med. 12, 341- 343 (1995).
- Gupta, T., Mullins, M. C., Dissection of Organs from the Adult Zebrafish. <http://www.jove.com/details.php?id=1717> doi: 10.3791/1717. J Vis Exp. 37 (2010).

10. Kinkel, M. D., Eames, S. C., Philipson, L. H., Prince, V. E., Intraperitoneal Injection into Adult Zebrafish. <http://www.jove.com/details.php?id=2126> doi: 10.3791/2126. J Vis Exp. 42 (2010).
11. Pugach, E. K., Li, P., White, R., Zon, L., Retro-orbital Injection in Adult Zebrafish. <http://www.jove.com/details.php?id=1645> doi: 10.3791/1645. J Vis Exp. 34 (2009).