

## **MECANISMES MOLECULARS DURANT LA HIDRATACIÓ DE L'OU DE PEIXOS MARINS: PAPER D'UNA NOVA SUBFAMÍLIA DE CANALS MOLECULARS D'AIGUA**

Mercedes Fabra, Angele Tingaud-Sequeira, Joan Cerdà\*

Laboratori IRTA-CSIC. Institut de Ciències del Mar (CSIC).

Passeig marítim, 37-49. 08003 Barcelona. Tel. 932 309 531. Fax 932 309 555. Adreça electrònica: [jcerda@icm.csic.es](mailto:jcerda@icm.csic.es).

---

### *Resum*

La flotabilitat positiva dels ous de peixos marins en l'oceà és un factor crític per a la seva supervivència i dispersió. Aquest procés està precedit per una remarcable hidratació de l'oòcit induïda per hormones a través de mecanismes moleculars desconeguts. En aquest treball revisem dades recents que indiquen que la hidratació de l'oòcit és un procés altament controlat basat en la interacció entre la proteòlisi del vitel, per a produir la força osmòtica, i un nou canal molecular d'aigua (aquaporina, AQP), SaAQP1o, per a mitjançar l'entrada d'aigua a l'oòcit. La SaAQP1o pertany a una nova subfamília de canals moleculars d'aigua similars a l'AQP1 específicament evolucionada en peixos, aparentment especialitzada en la hidratació de l'oòcit sota control hormonal i potser en altres mecanismes osmoreguladors encara desconeguts.

**Paraules clau** Oòcit, maduració meiòtica, aquaporines.

### *Abstract*

**Molecular mechanisms during oocyte hydration in marine fish: role of a novel subfamily of molecular water channels.** The positive buoyancy of marine fish eggs in the ocean is critical for their survival and dispersal. It is preceded by a remarkable oocyte hydration induced by meiotic maturation-inducing hormones through unknown molecular mechanisms. Here, we review recent data showing that fish oocyte hydration is a highly controlled process based on the interplay between protein hydrolysis, producing the osmotic driving force, and a novel molecular water channel (aquaporin, AQP), SaAQP1o, mediating water uptake. The SaAQP1o belongs to a unique subfamily of AQP1-like channels specifically evolved in teleosts apparently specialized in hormone-induced oocyte hydration, and perhaps in other yet unknown osmoregulatory mechanisms.

**Key words** oocyte, meiotic maturation, aquaporins.

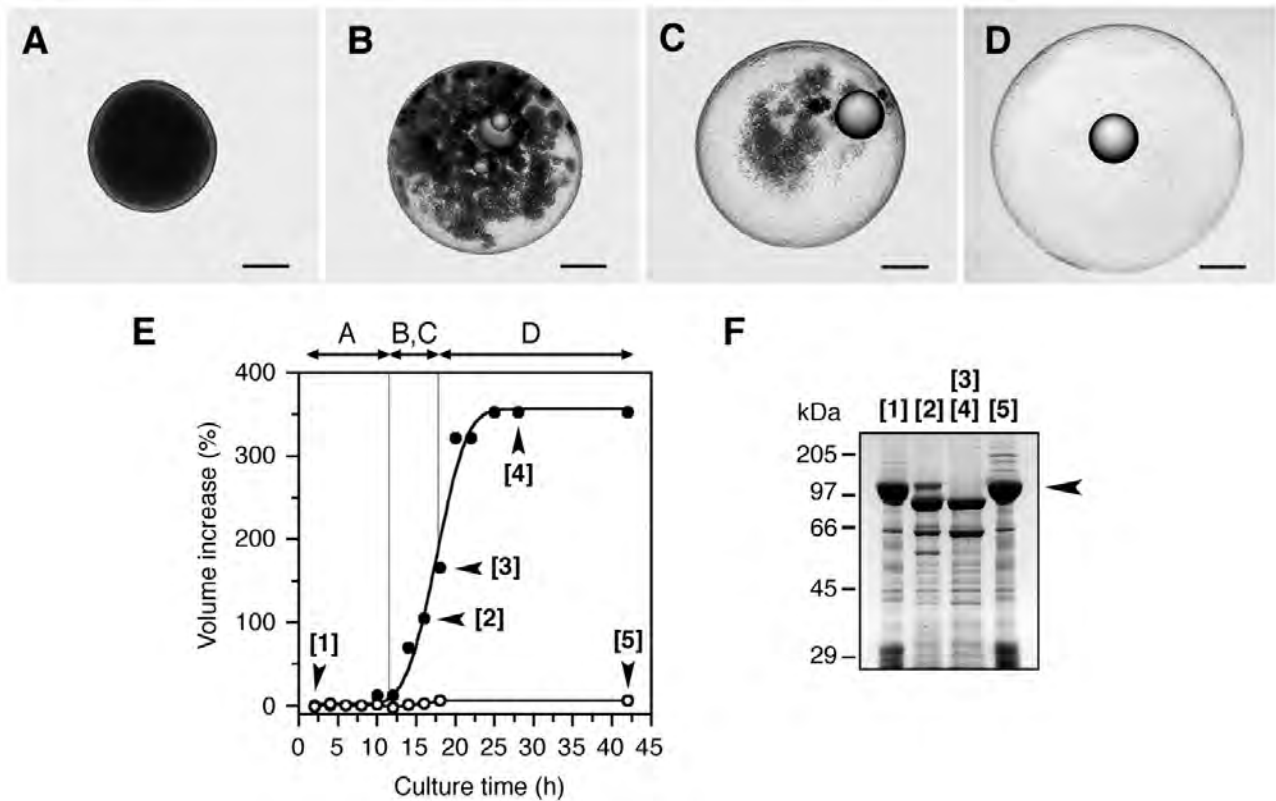
---

## **INTRODUCCIÓ**

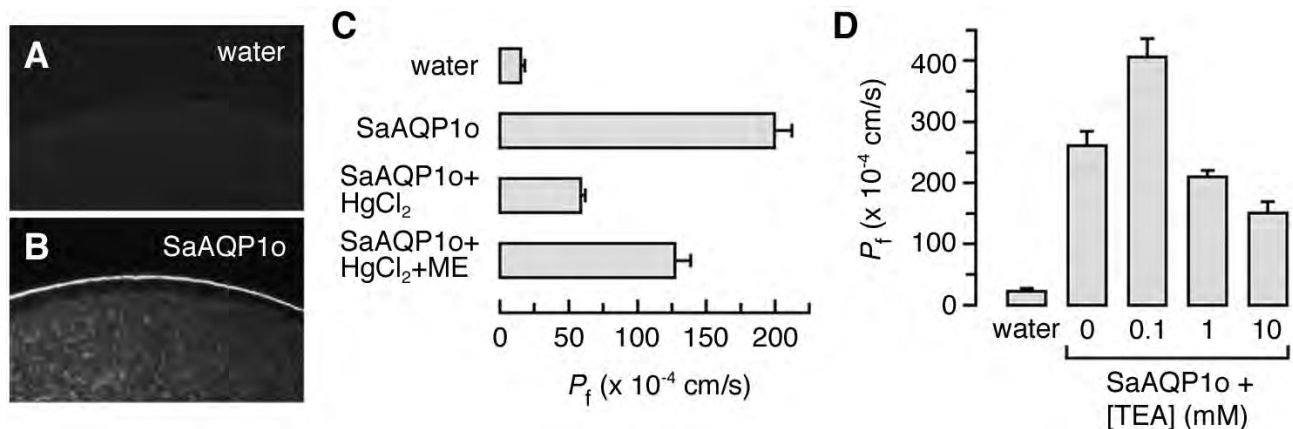
En teleostis i altres vertebrats, l'oòcit finalitza la meiosi (maduració) després del període de creixement (vitel·logènesi) en resposta a l'esteroides inductor de la maduració (MIS) alliberat per les cèl·lules somàtiques associades a l'oòcit (Nagahama *et al.*, 1995). En alguns teleostis, especialment en espècies marines que produeixen ous pelàgics o flotants (espècies pelagòfiles), els oòcits experimenten un ràpid augment de volum durant la maduració com a conseqüència d'una entrada masiva d'aigua, procés conegut com a *hidratació del oòcit*. Aquest procés, inicialment descrit per Fulton fa més de cent anys (Fulton, 1898) contribueix a la flotabilitat dels ous en aigua de mar, facilita

l'intercanvi d'oxigen amb l'atmosfera i la dispersió dels ous i embrions en l'oceà, i augmenta així la seva supervivència (Meloner, 1994).

El principal mecanisme fisiològic implicat en la hidratació de l'oòcit de peixos està relacionat amb un augment en aminoàcids lliures dintre de l'oòcit, com a conseqüència de la proteòlisi de les proteïnes del vitel activada durant el procés de maduració, cosa que crea la força osmòtica per a l'entrada d'aigua a l'oòcit (p. ex., Finn *et al.*, 2002). Tanmateix, l'acumulació de ions inorgànics durant la maduració meiòtica, com el  $K^+$  o el  $Na^+$ , també contribueix a la hidratació, i en el cas de peixos marins que produeixen ous hidratats però no flotants (espècies bentòfiles) aquest sembla ser el principal mecanisme implicat (Wallace *et al.*,



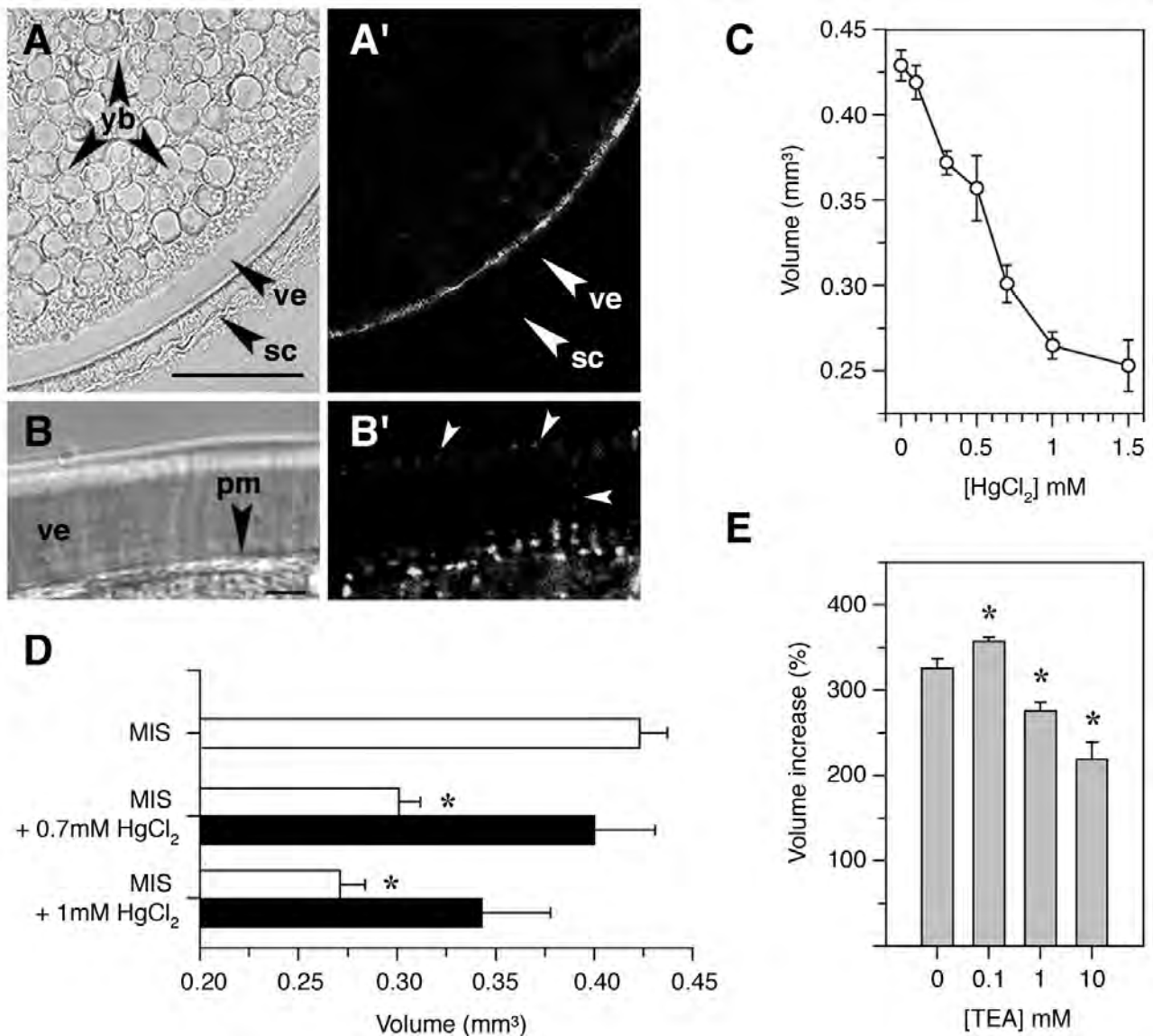
**Figura 1** Maduració i hidratació de l'òcít de l'orada *in vitro*. **A-D**: Fotografies dels òcits durant la maduració. Barra, 200  $\mu$ m. **E**: Increment de volum en un òcít individual al llarg del temps en presència del MIS (punts negres) o etanol (punts blancs). Les lletres corresponen als diferents estats durant la maduració indicats en A-D. **F**: Electroforesi de les principals proteïnes del vitel en òcits en diferents moments durant la hidratació (els nombres corresponen al plafó E). La fletxa indica proteòlisi de la lipovitelina.



**Figura 2** Expressió de la SaAQP1o en òcits de *Xenopus laevis*. **A-B**: Imatges d'immunofluorescència que indiquen la localització de la proteïna de SaAQP1o a la membrana plasmàtica de l'òcít injectat amb 10 ng de SaAQP1o cRNA amb un antisèrum contra la SaAQP1o (A, òcits control injectats amb aigua). **C**: Permeabilitat osmòtica a l'aigua dels òcits que expressen SaAQP1o, i la seva inhibició i recuperació amb HgCl<sub>2</sub> i  $\beta$ ME. **D**: Inhibició de la permeabilitat a l'aigua mitjançada per SaAQP1o amb tractament amb TEA.

1992). No obstant això, els potencials mecanismes per al transport d'aigua a l'òcít de teleostis són completament desconeguts tant en espècies pelagòfiles com bentòfiles.

L'extensa hidratació de l'òcít de peixos pelagòfils podria ser consistent amb el paper de canals moleculars especialitzats en el transport d'aigua a través de membranes, també coneguts com a *aquaporines*

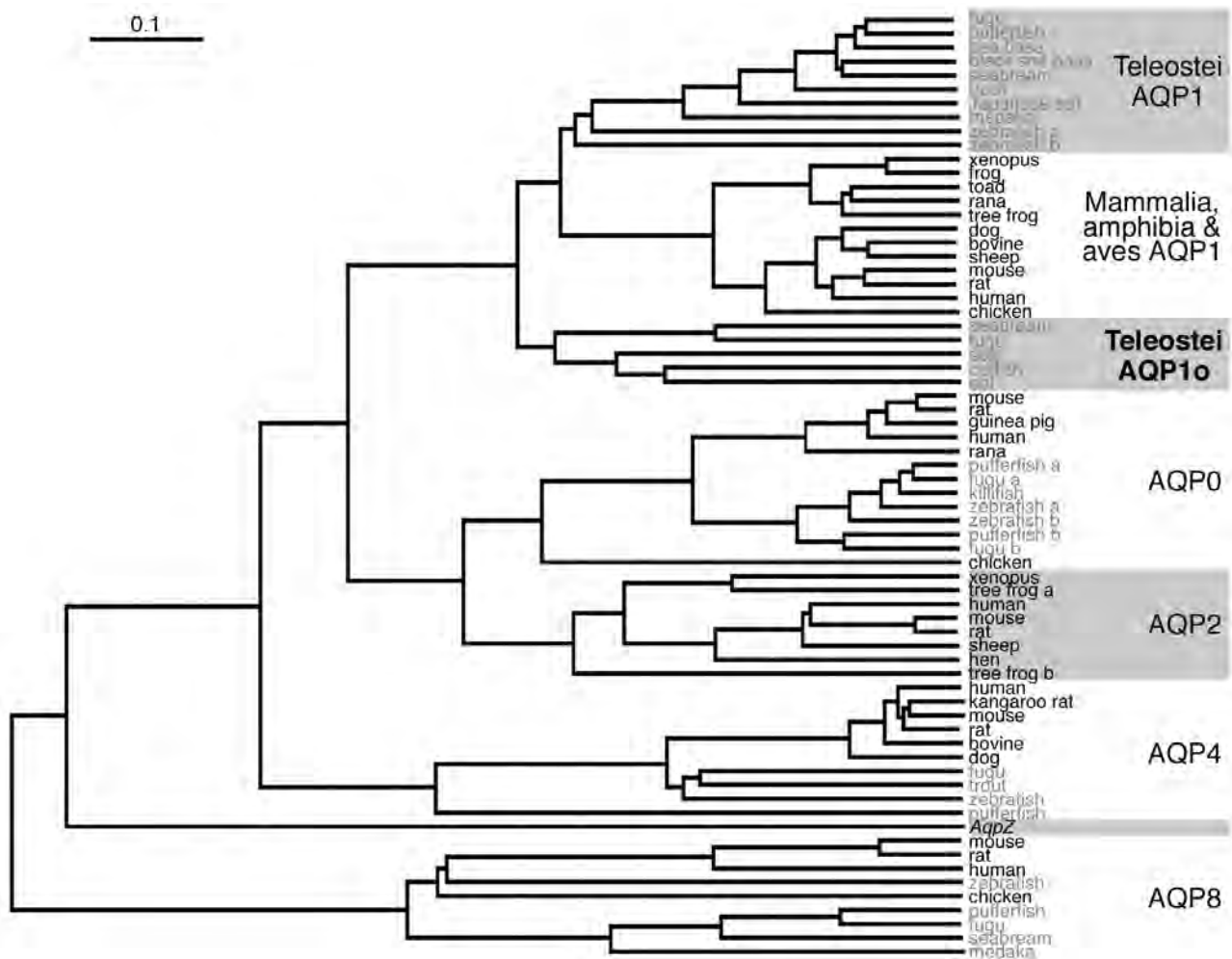


**Figura 3** **A-B:** Imatges d'immunofluorescència que indiquen la localització de la SaAQP1o sota la membrana d'òcits postvitel·logènics (A, A') i avui és conegut que formen una superfamília gènica amb almenys tretze membres diferents en mamífers: AQP0, AQP1, AQP2, AQP3, AQP4, AQP5, AQP6, AQP7, AQP8, AQP9, AQP10, AQP11 i AQP12 (Agre *et al.*, 2002). La superfamília de les AQP pot ser dividida en dos grups: aquelles que són exclusivament permeables a l'aigua (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5 i AQP8) i aquelles que també són permeables a petits soluts com el glicerol o la urea (aquagliceroporines; AQP3, AQP7, AQP9 i AQP10). Les AQP s'expressen en molts teixits o cèl·lules on el transport d'aigua és important, i

**C:** Inhibició sobre l'augment de volum dels òcits d'orada durant la maduració meiótica *in vitro* amb dosis creixents de HgCl<sub>2</sub>. **D:** Inhibició de la hidratació amb HgCl<sub>2</sub> (barres blanques) i reversibilitat de l'efecte del mercuri mitjançant tractament amb βME (barres negres). **E:** Inhibició de la hidratació de l'òcít de l'orada amb TEA.

(AQP). Aquestes proteïnes van ser descobertes fa uns quinze anys (Denker *et al.*, 1988), i avui és conegut que formen una superfamília gènica amb almenys tretze membres diferents en mamífers: AQP0, AQP1, AQP2, AQP3, AQP4, AQP5, AQP6, AQP7, AQP8, AQP9, AQP10, AQP11 i AQP12 (Agre *et al.*, 2002). La superfamília de les AQP pot ser dividida en dos grups: aquelles que són exclusivament permeables a l'aigua (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5 i AQP8) i aquelles que també són permeables a petits soluts com el glicerol o la urea (aquagliceroporines; AQP3, AQP7, AQP9 i AQP10). Les AQP s'expressen en molts teixits o cèl·lules on el transport d'aigua és important, i

en pràcticament tots els organismes, des de bacteris fins a mamífers. Les proves recents que indiquen un important paper de les AQP en el transport d'aigua en l'ovari de mamífers (McConnell *et al.*, 2002) fan raonable la hipòtesi del paper d'aquestes proteïnes en el procés d'hidratació de l'òcít de peixos. En aquest treball revisarem resultats d'investigacions molt recents en suport d'aquesta hipòtesi, cosa que ha portat, tanmateix, al descobriment d'una nova subfamília d'AQP en teleostis.



**Figura 4** Relacions filogenètiques entre proteïnes d'AQP selectives a l'aigua en vertebrats. La seqüència d'aminoàcids de l'AQP d'*Escherichia coli* (*AqpZ*) va ser utilitzada com a referència. La barra representa la distància genètica entre les seqüències.

### L'AQUAPORINA SaAQP1o I LA SEVA FUNCIO D'URANT LA HIDRATACIO DE L'OOCIT

L'orada, *Sparus aurata*, és una espècie pelagòfila que produeix ous molt hidratats i, per tant, ofereix un excel·lent model per a la investigació del paper de les AQP durant la hidratació de l'oòcit. En aquesta espècie, la quantificació del procés d'hidratació de l'oòcit en resposta al MIS, 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (17,20 $\beta$ P) *in vitro* ha revelat que la hidratació es dona de forma progressiva durant aproximadament deu hores, la qual cosa porta a un augment d'aproximadament 4,5 i 1,5 ordres de magnitud en el volum i contingut d'aigua de l'oòcit, respectivament (Fabra *et al.*, 2005). No obstant això, la hidratació de l'oòcit sembla accelerada en un període d'aproximadament dues hores, justament en el moment de la màxima proteòlisi de les principals proteïnes del vitel (lipovitellina) i, per tant, quan es crea aparentment la pressió osmòtica més ele-

vada dintre de l'oòcit (vegeu la figura 1, estat oocitari 3).

Per tal de comprovar si la relativament ràpida hidratació de l'oòcit de l'orada podria estar regulada per AQP cebadores degenerades d'oligonucleòtids, compostos a partir de regions altament conservades entre els membres de la superfamília de les AQP, van ser utilitzats per aïllar cDNA d'AQP en l'ovari de l'orada mitjançant RT-PCR. Es va aïllar un cDNA complet que mostrava sis dominis transmembrana i dos regions asparagina-prolina-alanina (NPA), que són característiques de la superfamília de les AQP (Fabra *et al.*, 2005). La seqüència d'aminoàcids deduïda del cDNA aïllat va mostrar la màxima identitat amb l'AQP1 de mamífers, i aminoàcids específics en la regió potencialment involucrada en el transport d'aigua que estan conservats en les AQP però no en les aquagliceroporines. D'acord amb aquestes característiques estructurals, el cDNA expressat artificialment en oòcits de *Xenopus laevis* va

demonstrar ser selectivament permeable a l'aigua (i no permeable al glicerol o la urea), la qual cosa podia ser inhibida per clorur de mercuri ( $\text{HgCl}_2$ ) i seguidament recuperat per  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ ME); mostra, d'aquesta manera, propietats funcionals similars a l'AQP1 de mamífers (Preston *et al.*, 1992) (vegeu la figura 2a-c). No obstant això, el grau d'identitat del cDNA aïllat en l'orada i l'AQP1 de mamífers va ser lleugerament més baix (60%) que el trobat entre altres seqüències de peixos potencialment AQP1, dipositades en bases de dades, i els corresponents ortòlegs de mamífers (62-66%). A més, a diferència de l'AQP1 de mamífers, que s'expressa en molts teixits diferents, l'mRNA de l'AQP aïllada en l'orada apareixia de forma predominant en l'ovari (Fabra *et al.*, 2005). Basats en aquestes característiques inusuals, vàrem concloure que la proteïna codificada pel cDNA ovàric suposava una nova AQP en vertebrats, i l'hem anomenada *AQP1 de l'ovari d'orada* (SaAQP1o).

Mitjançant un antisèrum purificat, hem localitzat la SaAQP1o en l'ovari de l'orada. L'única immunoreacció es troba en el citoplasma de l'oòcit i no en les cèl·lules somàtiques que envolten l'oòcit, i aquesta es comença a detectar en la part més cortical dels oòcits que es troben a l'inici de la vitel·logènesi (Fabra *et al.*, 2005). A mesura que els oòcits avancen en la vitel·logènesi la SaAQP1o és translocada cap a una zona més perifèrica de l'oòcit, i quan aquests procés finalitza la SaAQP1o apareix localitzada en una zona justament per sota de la membrana plasmàtica de l'oòcit (vegeu la figura 3a). Durant la maduració meiòtica, i més específicament quan comença la màxima proteòlisi del vitel i està a punt de començar la hidratació de l'oòcit més marcada, la SaAQP1o és aparentment translocada a la membrana plasmàtica de l'oòcit i apareix en les microvellositats que travessen l'embolcall vitel·lí (vegeu la figura 3b). Per tant, la localització de la SaAQP1o durant la maduració de l'oòcit seria consistent amb el seu paper en la captació d'aigua per l'oòcit una vegada ha estat creat el gradient osmòtic a causa de la proteòlisi del vitel.

Per tal d'esbrinar el significat funcional de la característica localització cel·lular de la SaAQP1o en l'oòcit d'orada, es van dur a terme incubacions *in vitro* de fol·licles ovàrics a l'inici de la maduració en presència o absència de inhibidors de l'activitat de les AQP. A més de l' $\text{HgCl}_2$ , també es van utilitzar tetraetilamoni (TEA), conegut inhibidor de canals iònics que es capaç d'afectar també l'activitat de la SaAQP1o (vegeu la figura 2d) i de l'AQP1 de mamífers (Brooks *et al.*, 2000) expressades en oòcits de *X. laevis*. El tractament de fol·licles ovàrics d'orada amb  $\text{HgCl}_2$  va ser capaç d'inhibir els augments en volum de l'oòcit a causa de la hidratació, i aquesta inhibició va ser revertida amb trac-

tament amb  $\beta$ ME (vegeu la figura 3c i d). Tanmateix, la presència de 10 mM de TEA va reduir l'augment de volum dels oòcits d'orada, però dosis baixes d'aquest compost estimulaven la hidratació (vegeu la figura 3e), igual com s'observa en oòcits de *X. laevis* que expressen la SaAQP1o (vegeu la figura 2d). Aquests resultats indiquen que el tipus de permeabilitat dels oòcits de l'orada en resposta a l' $\text{HgCl}_2$  i TEA és molt semblant al que presenta la SaAQP1o en oòcits de *X. laevis*. Per tant, aquestes dades, juntament amb la característica localització intracel·lular de la SaAQP1o en el oòcit, proporcionen bones proves del paper d'aquesta nova AQP en el mecanisme d'hidratació de l'oòcit en l'orada.

### IDENTIFICACIÓ DE LA SUBFAMÍLIA AQP1o EN PEIXOS

L'aïllament i caracterització molecular de la SaAQP1o ens va portar a cercar AQP similars en l'orada mitjançant el cribratge d'una genoteca de cDNA de ronyó. Es va aïllar un nou cDNA que presentava una identitat elevada de la seva seqüència d'aminoàcids amb les seqüències de l'AQP1 de mamífers (63-67%) i d'altres peixos (88-94%), i era només un 60% idèntica a la SaAQP1o. Aquest segon cDNA era també selectivament permeable a l'aigua i sensible a l' $\text{HgCl}_2$  quan era expressat en oòcits de *X. laevis*, i apareixia estar expressat en molt més teixits que la SaAQP1o. Aquestes característiques, doncs, eren més semblants a l'AQP1 de mamífers, i en conseqüència aquest cDNA es va anomenar SaAQP1.

Per tal d'investigar les relacions entre la SaAQP1o, la SaAQP1 i altres AQPs selectives a l'aigua en vertebrats es van identificar seqüències similars en diverses espècies de teleostis mitjançant clonatge per homologia i cerca en genomes seqüenciats. Amb les noves seqüències obtingudes, l'anàlisi filogenètica de les AQP selectives a l'aigua en vertebrats indica l'existència de dos grups d'AQP en almenys alguns teleostis (vegeu la figura 4). El primer grup el componen els ortòlegs pròpiament de l'AQP1 de mamífers, els quals mostren un 64-67% d'identitat amb les seqüències de mamífers, aus i amfibis, mentre que l'altre grup està format per diverses AQP relacionades amb la SaAQP1o, que semblen ser expressades en l'ovari de diferents teleostis, com el llenguado (*Solea senegalensis*), l'anguila europea (*Anguilla anguilla*), el fugu (*Takifugu rubripes*) i el peix gat (*Ictalurus punctatus*). Aquestes últimes seqüències presenten un 58-62% d'identitat amb altres AQP1 de vertebrats; per tant, més baixa que les seqüències d'AQP1 de peixos, i només un 63-70% d'identitat amb les AQP1 de teleostis. La

identitat entre les AQP1o de peixos és, però, variable (des de 60% fins a 82%), i és la més elevada entre les AQP1o de perciformes (orada) i tetraodontiformes (fugu). Un fet remarcable, no obstant això, és que les AQP1o de teleostis representen un *cluster* separat d'altres AQP1 de vertebrats, i mostra branques més llargues que les AQP1 de peixos. Aquestes observacions, per tant, suggereixen una ràpida i específica evolució de la nova subfamília AQP1o en teleostis, molt probablement derivada a partir d'un gen ancestral comú codificador d'AQP1.

L'aparent ràpida aparició de les AQP1o ovàriques en peixos podria haver estat facilitada pel procés de duplicació gènica que possiblement va tenir lloc abans de la radiació dels teleostis durant l'evolució (Postlethwait *et al.*, 2004). Aquest mecanisme pot haver permès el desenvolupament d'una còpia d'un gen en una funció específica (com en aquest cas per la SaAQP1o en la hidratació de l'òocit), i quedaria la funció inicial en el gen ancestral (p. ex., AQP1). Aquesta situació pot quedar exemplificada en el peix zebra (*Danio rerio*) on es poden trobar dues còpies tant d'AQP1 com de AQP0, possiblement com a resultat de la duplicació gènica que va tenir lloc durant l'evolució d'aquesta espècie (Postlethwait *et al.*, 2000). L'aparició de l'AQP1o en peixos marins es podria entendre si considerem que al principi de l'evolució els peixos van evolucionar des d'aigua marina cap a aigua dolça, però durant el període Juràssic, els peixos van colonitzar un altre cop l'oceà (Long, 1995). Aquesta transició molt probablement va requerir certes adaptacions osmòtiques, com la hidratació de l'òocit mitjançant la proteòlisi del vitel com un pas clau per a alleujar la pèrdua passiva d'aigua imposada per la hiperosmolaritat de l'aigua de mar (Fyhn *et al.*, 1999). Les AQP1o podria haver evolucionat en teleostis pelagòfils per a regular aquest procés, i haurien aconseguit, a més, una flotabilitat positiva dels ous en el mar per a millorar la seva supervivència. D'aquesta forma, el descobriment de la subfamília d'AQP1o en peixos il·lustra com aquests organismes s'han adaptat a un medi hiperosmòtic durant la seva evolució.

Com ja s'ha esmentat, els canals d'aigua AQP1o han estat trobats sobretot en diferents teleostis pelagòfils que produeixen ous altament hidratats. No obstant això, s'ha identificat també una seqüència relacionada amb la SaAQP1o en l'ovari del peix gat, espècie d'aigua dolça que no produeix ous flotants. La presència d'AQP1o en el peix gat pot ser el resultat d'un gen AQP1o heretat dels ancestres dels peixos abans de la seva entrada en l'aigua dolça. D'aquesta forma, l'AQP1o podria estar encara present en algunes d'aquestes espècies i haver desenvolupat una funció similar a la que pot dur a terme en peixos marins,

ser simplement redundant, o tenir una altra funció osmoreguladora dintre de l'ovari. En aquests sentit, en salmònids i altres peixos «primitius», com els ciprinodontiformes o siluriformes (peix gat), s'ha descrit una baixa però contínua hidratació del vitel o de l'òocit durant el creixement i maduració, i ha resultat en alguns casos un lleuger augment de volum de l'òocit (Potts i Rudy, 1969; Iwamatsu *et al.*, 1992; Selman *et al.*, 1993). Per tant, és plausible que les AQP1o en peixos d'aigua dolça puguin tenir una funció anàloga a la SaAQP1o, si bé aquesta hipòtesi encara no ha estat demostrada.

## CONCLUSIONS

El recent descobriment de la SaAQP1o en l'òocit de l'orada ha provat un dels mecanismes moleculars clau en el procés de transport d'aigua al òocit de teleostis. En aquesta espècie, les nostres observacions indiquen que el procés d'hidratació de l'òocit és un mecanisme altament controlat basat en la interacció entre la proteòlisi del vitel i la SaAQP1o. De manera remarcable, AQP relacionades amb l'AQP1o han estat identificades sobretot en teleostis pelagòfils, i això suggereix que en aquestes espècies l'AQP1o podria haver-se especialitzat en la regulació del procés d'hidratació de l'òocit induït per hormones. Aquesta regulació podria facilitar una ràpida i controlada hidratació cel·lular, la qual cosa seria essencial en aquelles espècies que ovulen diverses vegades consecutives durant l'època de reproducció, com l'orada, el llenguado o el fugu. No obstant això, són necessaris estudis futurs per a confirmar aquesta hipòtesi i per a determinar la possible regulació hormonal sobre l'expressió del gen de l'AQP1o, la seva traslocació intracel·lular o la seva funció. La recerca sobre aquests interrogants contribuirà indubtablement a un coneixement més profund dels mecanismes biològics implicats en la hidratació de l'òocit de teleostis, la qual cosa pot tenir importants aplicacions biotecnològiques en aqüicultura.

## BIBLIOGRAFIA

- AGRE, P.; KING, S. L.; YASUI, M.; GUGGINO, W. B.; OTTERSEN, O. P.; FUJIYOSHI, Y.; ENGEL, A.; NIELSEN, S. (1992). «Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine». *J. Physiol.*, 542:3-16.
- BROOKS, H. L.; REGAN, J. W.; YOOL, A. J. (2000). «Inhibition of aquaporin-1 water permeability by tetraethylammonium: involvement of the E pore region». *Mol. Pharmacol.*, 57:1021-1026
- DENKER, B. M.; SMITH, B. L.; KUHAJDA, F. P.; AGRE, P.

- (1988). «Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules». *J. Biol. Chem.*, 263:15634-15642.
- FABRA, M.; RALDÚA, D.; POWER, D. A.; DEEN, P. M. T.; CERDÀ, J. (2005). «Marine fish egg hydration is aquaporin-mediated». *Science*, 307:545.
- FINN, R. N.; OSTBY, G. C.; NORBERG, B.; FYHN, H. J. (2002). «In vivo oocyte hydration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): proteolytic liberation of free amino acids, and ion transport, are driving forces for osmotic water influx». *J. Exp. Biol.*, 205:211-224.
- FULTON, T. W. (1898). «On the growth and maturation of the ovarian eggs of teleostean fishes». *16th Annu. Rep. Fish. Bd. Scotl.*, 3:83-134.
- FYHN, H. J.; FINN, R. N.; REITH, M.; NORBERG, B. (1999). «Yolk protein hydrolysis and oocyte free amino acids as key features in the adaptative evolution of teleost fishes to seawater». *Sarsia*, 84:451-456.
- IWAMATSU, T.; TAKAHASHI, S. Y.; OH-ISHI, T.; YOKOCHI, T.; MAEDA, H. (1992). «Changes in electrophoretic patterns of oocyte proteins during oocyte maturation in *Oryzias latipes*». *Dev. Growth Differ.*, 34:173-179.
- LONG, J. A. (1995). *The rise of fishes. 500 millions years of evolution*. Baltimore: The John Hopkins University Press.
- MCCONNELL, N. A.; YUNUS, R. S.; GROSS, S. A.; BOST, K. L.; CLEMENS, M. G.; HUGHES, F. M. JR. (2002). «Water permeability of an ovarian antral follicle is predominantly transcellular and mediated by aquaporins». *Endocrinology*, 143:2905-2912.
- MELLINGER, P. J. (1994). «La flottabilité des oeufs de Téléostéens». *L'Année Biologie*, 33:117-138.
- NAGAHAMA, Y.; YOSHIKUNI, M.; YAMASHITA, M.; TOKUMOTO, T.; KATSU, Y. (1995). «Regulation of oocyte growth and maturation in fish». *Curr. Top. Dev. Biol.*, 30:103-45.
- POSTLETHWAIT, J. H.; WOODS, I. G.; NGO-HAZELETT, P.; YAN, Y. L.; KELLY, P. D.; CHU, F.; HUANG, H.; HILL-FORCE, A.; TALBOT, W. S. (2000). «Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes». *Genome Res.*, 10:1890-1902.
- POSTLETHWAIT, J.; AMORES, A.; CRESKO, W.; SINGER, A.; YAN, Y. L. (2004). «Subfunction partitioning, the teleost radiation and the annotation of the human genome». *Trends Genet.*, 20:481-490.
- POTTS, W. T.; RUDY, P. P. (1969). «Water balance in the egg of the Atlantic salmon, *Salmo salar*». *J. Exp. Biol.*, 50:223-237.
- PRESTON, G. M.; CARROLL, T. P.; GUGGINO, W. B.; AGRE, P. (1992). «Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing cell CHIP28 protein». *Science*, 256:385-387.
- SELMAN, K.; WALLACE, R. A.; SARKA, A.; QI, X. (1993). «Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*». *J. Morphol.*, 218:203-224.
- WALLACE, R. A.; GREELEY, M. S. JR.; MCPHERSON, R. (1992). «Analytical and experimental studies on the relationship between Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and water-uptake during volume increases associated with *Fundulus* oocyte maturation in vitro». *J. Comp. Physiol.*, 162B:241-248.