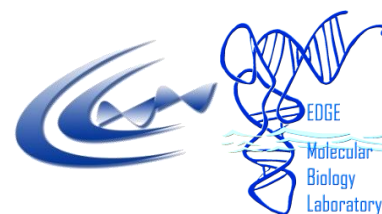




UNIVERSIDADE DO ALGARVE

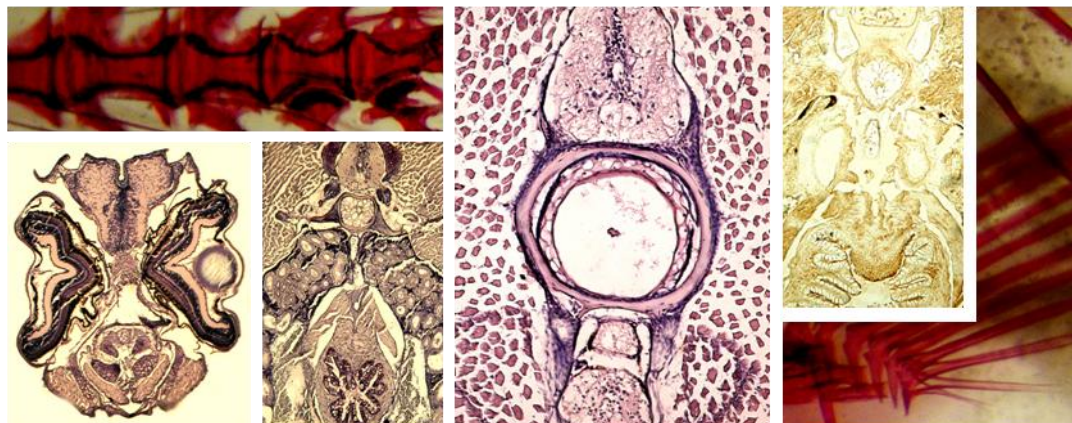
Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente



O efeito da dieta na sobrevivência e no desenvolvimento esquelético e digestivo de larvas e juvenis de peixe-zebra *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

Dissertação do Mestrado em Biologia Marinha

João Pedro Gonçalves Cardeira da Silva



Faro
2009

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente

O efeito da dieta na sobrevivência e no desenvolvimento esquelético e digestivo de larvas e juvenis de peixe-zebra *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

Dissertação do Mestrado em Biologia Marinha

Nome: João Pedro Gonçalves Cardeira da Silva

Orientadores: Professora Doutora Leonor Cancela
Doutor Paulo Gavaia

Estágio realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Ciências do Mar do Algarve (CCMAR)

Faro
2009

O trabalho apresentado é da exclusiva responsabilidade do autor,

João Carneira da Silva

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Leonor Cancela, por ter aceite orientar-me neste trabalho, acolhendo-me no laboratório e, assim, ter contribuído para o meu desenvolvimento académico e para o aumento do meu conhecimento científico.

Ao Doutor Paulo Gavaia, por ter aceite ser meu orientador, pela paciência e pela passagem de conhecimentos importantes e essenciais.

À Anabela, pela ajuda preciosa no dia-a-dia do laboratório desde o início do trabalho. Pela paciência, boa disposição, pelo gosto no trabalho que, de alguma forma, me incutiu e pela amizade que foi demonstrando no decorrer destes longos meses.

À Gi, enquanto académica, amiga e colega de trabalho. Pelos preciosos ensinamentos de aquacultura, pela paciência, pelas horas gastas em prol dos outros, pela amizade.

A todos os elementos do Laboratório de Biologia Molecular que, de algum modo, contribuíram para a minha integração no grupo, por todas as ajudas e pelo bom ambiente.

Ao João Sendão e todos os elementos do PRODEP, sem os quais não teria sido possível a realização dos cultivos. Pela ajuda, disponibilidade e boa disposição.

A todos os meus amigos, que agora descrevo, pela enorme amizade.

À Andreia, pela constante presença na minha vida, compreensão e ajuda.

À Patrícia, pela boa disposição, pela má disposição, pela entropia.

Ao Xavi, pela confiança e boa disposição.

À Vera, pelo companheirismo, pelos sermões, pela preocupação, por me ter mostrado os pontos errados, por ter realçado os certos, por ter estado presente nestes cinco bons anos e porque vai estar presente em tantos outros.

Ao Rui (pGem), companheiro de quarto, companheiro de laboratório, de estágio e companheiro de muitas outras situações. Pela ajuda no trabalho, pela preocupação, pela impertinência.

Ao Ricardo (Esbro), “ex”-colega de casa, pela presença, pela ajuda e pela paciência (ou falta dela).

À Débora, pela compreensão, paciência, pela partilha de interesses e modos de pensar, pelas chamadas de atenção.

À Ângela, pela constante disponibilidade para os amigos, pela bondade.

À Sara (Maria Albertina), pela constante presença, ajuda e disponibilidade.

Ao Samurai e ao King, pela partilha do interesse musical, pel’Os Bohēmius, pelos bons momentos desde 2003.

À Dii, pela presença e amizade internacionalmente demonstrada, em terreno sul-americano ou português.

À Pipa e à Mónica, pela sinceridade e presença.

À Pintinha, pela distração, alegria e presença.

À Rita, à Xana, à Trombone, por pertencerem a este grupo e pela amizade.

À Joana Revez, pela loucura, pela paixão pela ciência.

Ao meu Avô Joaquim, por ter contribuído, em grande parte para a minha formação pessoal, pelo orgulho, pela dedicação à família.

À minha Avó Li, por ter, parcialmente, contribuído para o meu “gene” da distração, por estar presente na minha vida, pelas conversas, pelo amor.

Ao meu Pai que, de algum modo, contribuiu para o meu crescimento pessoal.

Ao meu Avô Florindo, sem o qual seria impossível a minha formação. Pelos ensinamentos, pelo amor pelos netos.

À minha Avó Zezinha, pela força, pelo amor, pela dedicação, por dar tudo em prol de todos, pela humildade, por ser o melhor lado da humanidade.

À minha irmã Lilly, por ter entrado na minha vida recentemente e ser um exemplo de alegria.

À minha irmã Bárbara, o meu orgulho, por estar sempre presente, pelo apoio, pelo interesse, pela rebeldia, pela confiança recíproca, pelas saudades, pela companhia, porque vai estar sempre comigo, pelo amor.

À minha Mãe, principal responsável pelo meu desenvolvimento enquanto ser humano, sem a qual não seria o que hoje sou e não teria chegado onde cheguei; a quem dedico todo o meu trabalho académico e esforço nele depositado. Pelo apoio incondicional, pela eterna compreensão, porque esteve e estará sempre presente, pelo companheirismo, pela preocupação, pela ajuda, pelo interesse, pelo exemplo de força, pelo grande amor.

Resumo

O peixe-zebra é um teleósteo de água doce que, devido a várias características biológicas e genéticas, tem sido utilizado como modelo vertebrado em várias áreas de investigação, com grande potencial na biologia molecular, tornando-se necessária a optimização das suas condições de cultivo, nomeadamente a determinação de um regime dietético padronizado e adequado às necessidades nutricionais. Foram levados a cabo quatro regimes dietéticos distintos consistindo em rotíferos *Brachionus sp.*, nauplius de *Artemia* e alimento inerte (Cyclop-eezeTM e Benelux_{NV}). O efeito da dieta em larvas e juvenis de peixe-zebra foi, então, avaliado pela determinação dos parâmetros de sobrevivência e crescimento, bem como pela análise do desenvolvimento ao nível tecidual, celular e molecular em três fases de desenvolvimento distintas. Para tal, foram utilizadas ferramentas histológicas, de expressão genética e imunohistoquímica aplicadas a marcadores do desenvolvimento esquelético (proteína Gla da matriz – *mgp* – e osteocalcina – *oc*) e do tracto digestivo (*amilase* e *tripsina*). Foram, ainda, determinadas regiões de remodelação óssea e efectuada uma análise histológica ao nível do sistema digestivo.

Os dados obtidos sugerem que os rotíferos não constituem um alimento adequado aos requisitos larvares da espécie, apresentando as menores sobrevivências e um menor crescimento. Estes dados foram também suportados ao nível molecular. Nauplius de *Artemia* como alimento inicial e um desmame para alimento inerte aos 15 dias pós-fertilização não parece, também, ser um regime alimentar apropriado. Comparativamente, uma dieta composta exclusivamente por nauplius de *Artemia* apresentou parâmetros associados ao desenvolvimento superiores, pelo que é considerado um regime alimentar adequado, como tem vindo a ser discutido por vários autores. Uma mistura diária de alimentos parece ser também favorável ao desenvolvimento saudável do peixe-zebra. Este trabalho demonstrou que, nas fases iniciais de desenvolvimento do peixe-zebra deverão ser utilizados nauplius de *Artemia* como alimento, podendo a dieta ser complementada com outros alimentos para a obtenção de melhores resultados.

Palavras-chave: peixe-zebra, dieta, desenvolvimento esquelético, desenvolvimento digestivo, sobrevivência, crescimento.

Abstract

Zebrafish is a freshwater teleost which, due to several biological and genetic characters, has been widely used as a vertebrate model in a variety of research fields, with great potential in molecular biology. As a consequence of the increasing interest in zebrafish, the optimization of its rearing conditions becomes essential, such as the determination of a standardized feeding regime appropriate to this species'. Four different dietary regimes, composed of rotifers *Brachionus sp.*, *Artemia* nauplii and inert food (Cyclo-eeze™ e Benelux_{NV}), were carried out. The effect of diet in zebrafish larvae and juvenile fish was evaluated by the determination of the survival and growth parameters as well as by the analysis of the development at the tissue, cellular and molecular levels in three distinct developmental stages. For that, histological, gene expression and immunohistochemical tools applied to molecular markers of the skeletal development (matrix Gla protein – *mgp* – and osteocalcin – *oc*) and digestive tract development (*amylase* and *trypsin*) were used. The assessment of bone remodeling regions and a histological analysis of the digestive system were also carried out.

The obtained data suggest that rotifers are not appropriate for the larval requirements of this species, presenting the lowest survival and growth values. These data were also supported at the molecular level. *Artemia* nauplii and a weaning to inert food at 15 days post fertilization does not seem to be, also, an appropriate feeding regime. Comparatively, a diet composed exclusively by *Artemia* nauplii presented higher development-related parameters. These data suggest that this is a suitable food regime, as it has been argued by several authors. A daily mixture of foods also seems to be suitable to zebrafish healthy development. This work showed that, in zebrafish early development *Artemia* nauplii should be used as food and could be, possibly, supplemented with other foods to obtain better results.

Keywords: zebrafish, diet, skeletal development, digestive development, survival, growth.

Índice de abreviaturas

Bmp – proteína morfogenética do osso

BSA – albumina de soro de bovino

cDNA – DNA complementar

CP – comprimento padrão

CT – comprimento total

DAB – 3'3'-diaminobenzidina tetrahidrocloroeto

DEPC – dietil pirocarbonato

DHA – ácido docosaheptaenóico

DNA – ácido desoxiribonucleico

dNTP's – oligonucleótidos

dpf – dias pós-fertilização

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EPA – ácido eicopentaenóico

EtOH – etanol

Gla – ácido γ -carboxiglutâmico

Glu – ácido glutâmico

HK – *housekeeping* (gene padrão)

hpf – horas pós-fertilização

LB – largura da boca

MeOH – metanol

Mgp – proteína Gla da matriz

MOPS – 8-metoxipsoraleno

mRNA – RNA mensageiro

N-AS-TR-P – naftol AS-TR fosfato

O/N – *overnight* (durante a noite)

Oc ou Bgp – osteocalcina ou proteína Gla do osso

PBS – fosfato salino tamponado (*phosphate buffered saline*)

PCR – *polymerase chain reaction* (reacção em cadeia da polimerase)

PDVK – proteínas dependentes da vitamina K

PFA – paraformaldeído

PRS – pararosanilina

RNA – ácido ribonucleico

RNAse – ribonuclease

RT – transcrição/transcriptase inversa (*reverse transcription/transcriptase*)

SGR – *specific growth rate* (taxa específica de crescimento)

TESPA – 3-aminopropiltrióxido

TRAP – *tartrate resistant acid phosphatase* (fosfatase ácida resistente ao tartrato)

Índice

AGRADECIMENTOS	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Índice de abreviaturas	vii
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. O peixe-zebra: biologia natural e cultivo	1
1.1.1. O peixe-zebra como modelo de investigação.....	2
1.2. A nutrição em peixes.....	3
1.2.1. A importância do alimento nas fases iniciais de desenvolvimento	4
1.2.2. Alimento vivo <i>versus</i> alimento inerte	5
1.2.3. Alimento vivo.....	6
1.2.4. A digestão: o pâncreas exócrino e enzimas digestivas.....	6
1.3. O esqueleto: estrutura, função e ontogenia.....	8
1.3.1. Estrutura do osso e processos de ossificação	9
1.3.2. Estrutura da cartilagem.....	11
1.3.3. As deformações esqueléticas e o cultivo de peixes	12
1.3.4. As proteínas dependentes da vitamina K	14
II. OBJECTIVOS	19

III. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Reprodução e manutenção de ovos e larvas	20
3.2. Desenho experimental	20
3.3. Amostragem	22
3.4. Cultivo de alimento vivo	23
3.5. Determinação da mortalidade e crescimento.....	24
3.6. Análise de estados de mineralização e de anomalias esqueléticas	25
3.7. Análise da expressão genética.....	26
3.7.1. Extração do RNA total dos tecidos.....	26
3.7.2. Electroforese de RNA em gel de agarose com formaldeído	28
3.7.3. Análise da quantidade de RNA	29
3.7.4. Digestão do DNA com DNase	29
3.7.5. Transcrição inversa de mRNA (RT-PCR).....	29
3.7.5. Quantificação relativa da expressão genética por PCR em Tempo Real	30
3.7.6. Electroforese em gel de agarose.....	33
3.8. Preparação de secções histológicas	33
3.8.1. Inclusão das amostras em parafina.....	33
3.8.2. Corte das amostras em secções	33
3.8.3. Desparafinação	34
3.9. Demonstração da fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP) em secções	34
3.10. Imunolocalização de Oc e Mgp em secções.....	35
3.11. Caracterização histológica.....	37
3.11.1. Coloração com hematoxilina.....	37
3.11.2. Desidratação e montagem	37
3.12. Registo fotográfico.....	38
IV. RESULTADOS	39
4.1. Mortalidade e crescimento	39
4.2. Mineralização dos elementos esqueléticos.....	43
4.3. Análise de malformações esqueléticas	46
4.4. Expressão genética de <i>oc</i> e <i>mgp</i>	48
4.5. Acumulação de Oc e Mgp.....	49
4.6. Identificação de locais de reabsorção óssea	52
4.7. Expressão genética de <i>amilase</i> e <i>tripsina</i>	53
4.8. Desenvolvimento do tracto digestivo	54
V. DISCUSSÃO	57
5.1. Mortalidade e crescimento	57

5.2. Processos de mineralização e patologia esquelética.....	60
5.2.1. Desenvolvimento esquelético do peixe-zebra	60
5.2.2. Ocorrência de malformações.....	61
5.2.3. Expressão de marcadores do desenvolvimento esquelético	62
5.2.4. Acumulação de Oc e Mgp.....	63
5.2.5. Actividade osteoclástica.....	65
5.3. Maturação e desenvolvimento do sistema digestivo	65
5.3.1. Expressão de enzimas pancreáticas.....	65
5.3.2. Desenvolvimento do tracto digestivo e descrição do desenvolvimento global	67
VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	68
Referências bibliográficas.....	70

I. INTRODUÇÃO

1.1. O peixe-zebra: biologia natural e cultivo

O peixe-zebra *Danio rerio* (Hamilton, 1822) (figura 1) é um peixe teleósteo da família dos ciprinídeos da classe dos peixes com raios nas barbatanas, *Actinopterygii* (Nüsslein-Volhard *et al.*, 2002). É uma espécie indígena do sul da Ásia, amplamente distribuída por partes da Índia, Bangladesh, Nepal, Myanmar e Paquistão. Está, portanto, distribuída por ambientes com características climáticas extremas (estações chuvosas e secas pronunciadas), tendo sido encontrado em vários tipos de habitats, desde diques de irrigação, lagos artificiais, arrozais e correntes rápidas montanhosas (Lawrence, 2007; Spence *et al.*, 2007). É um reprodutor assíncrono, produz grandes quantidades de ovos e reproduz-se em pequenos grupos (Lawrence, 2007). Tem um desenvolvimento embrionário relativamente rápido, eclodindo entre 48 a 72 horas após a fertilização, em condições ótimas de crescimento, como foi pormenorizadamente descrito por Kimmel *et al.* (1995). É um peixe caracteristicamente carnívoro, alimentando-se naturalmente de uma série de crustáceos bentónicos e planctónicos, bem como de vermes e larvas de insecto (Lawrence, 2007; Spence *et al.*, 2007).



Figura 1: Peixe-zebra, *Danio rerio*.

Com o crescente uso do peixe-zebra na investigação científica e o consequente aumento do número de biotérios, o seu cultivo tem sido cada vez mais intenso e, deste modo, torna-se importante conhecer as condições ótimas de crescimento e reprodução do peixe-zebra. Apesar de ser uma espécie bastante tolerante a alterações ambientais, na medida em que sobrevive sob uma elevada amplitude dos parâmetros da qualidade da água, estão descritos os valores ótimos que permitem um crescimento ideal do peixe-zebra. Deste modo, Lawrence (2007) e Westerfield (2007) revêm os vários factores que influenciam o seu cultivo, desde as fases larvares às adultas, enfatizando os parâmetros da qualidade da água (temperatura, pH, dureza, salinidade, oxigénio dissolvido e produtos azotados) e a nutrição. A tabela I resume os parâmetros da qualidade da água

mais relevantes e os respectivos valores óptimos para o crescimento e manutenção do peixe-zebra.

Tabela I: Valores dos vários parâmetros da qualidade da água óptimos para o crescimento do peixe-zebra em cativeiro (adaptado de Lawrence (2007) e Westerfield (2007)).

Parâmetro	Valores óptimos
pH	~8.0
Temperatura	28.5 °C
Dureza	75-200 mg/L CaCO ₃
Salinidade	0.25 - 0.75 ppt
Oxigénio dissolvido	~ 7.8 mg/L
Produtos azotados	NH ₃ < 0.02 ppm
	NO ₂ ⁻ < 1 ppm
	NO ₃ ⁻ < 200 ppm

1.1.1. O peixe-zebra como modelo de investigação

São vários os atributos que elevam o peixe-zebra ao estatuto de organismo “modelo”, sendo de destacar o pequeno tamanho dos adultos, rápido desenvolvimento e tempo de geração curto, transparência óptica durante as fases iniciais de desenvolvimento (permitindo uma fácil visualização da morfologia tecidual e celular), fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário externos, embriões relativamente grandes e disponibilidade de dados provenientes de rastreios genéticos (Kimmel *et al.*, 1995; Nüsslein-Volhard, 2002; Lamason *et al.*, 2005; Lawrence, 2007). Estas características, juntamente com o facto de o genoma estar praticamente sequenciado e disponível em bancos de dados públicos (*Zebrafish Genome Sequencing Project* – http://www.ensembl.org/Danio_rerio/info/index), fazem com que adquira bastante popularidade no meio científico e seja, tal como o rato (Whitfield *et al.*, 2005), um óptimo modelo biológico de investigação em vertebrados. Por outro lado, a relação próxima e a elevada homologia entre os genomas humano e do peixe-zebra (Barbazuk *et al.*, 2000) contribuem bastante para o seu uso enquanto modelo de investigação biomédica, permitindo um estudo alargado de patologias. Estas características permitiram a realização de uma variedade de estudos, nomeadamente em biologia do desenvolvimento (Vogel & Weinstein, 2000), seus mecanismos e transposição a outras espécies, à biomedicina e à imunologia e estudo de doenças, como foi revisto por Keller & Murtha (2004), Pyati *et al.* (2007) e Meeker & Trede (2008). Estão ainda descritas várias vantagens da aplicação do peixe-zebra em estudos abrangendo a farmacologia

(Sumanas & Lin, 2004), toxicologia e respostas genéticas associadas (Spitsbergen & Kent, 2003; Hill *et al.*, 2005), reprodução (Laan *et al.*, 2002; Darrow & Harris, 2004), comportamento e neurologia (Gerlai, 2003; Fetcho *et al.*, 2008) e ainda na área da aquacultura (Dahm & Geisler, 2006). Estão, também, descritas linhas de transgênicos, nomeadamente, portadores de genes que codificam para proteínas fluorescentes, expressas em vários tipos celulares ou tecidos, como no músculo (*e.g.*, Wan *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2003), claramente vantajosos no estudo de processos biológicos e aplicação biotecnológica.

Por fim, existe um esforço global no desenvolvimento de programas especialmente focados na partilha de informação relativa à investigação utilizando o peixe-zebra (sequências, expressão genética, linhas mutantes, publicações) como o *zebrafish information network* (ZFIN – <http://zfin.org/ZFIN>) (Sprague *et al.*, 2001; Sprague *et al.*, 2006), incluindo a elaboração de bases de dados públicas.

O peixe-zebra constitui, deste modo, uma ferramenta poderosa essencial à actual investigação molecular, tornando-se fundamental um conhecimento profundo acerca da sua biologia, reprodução e manutenção em cativeiro e, em particular, acerca do seu perfil de requisitos nutricionais.

1.2. A nutrição em peixes

A nutrição em peixes tem sido um tema de interesse nas últimas décadas, como resposta ao desenvolvimento da indústria aquícola e à necessidade de optimização dos parâmetros de cultivo das várias espécies que daí advém. Porque o produto final em aquacultura se destina, na sua grande maioria, ao consumo humano (FAO, 2007), a investigação tem sido mais intensa em espécies com elevado interesse comercial, como o linguado senegalês *Solea senegalensis* (Kaup) (*e.g.*, Cañavate & Fernández-Díaz, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999; Conceição *et al.*, 2007), a dourada *Sparus aurata* (L.) (*e.g.*, Fernández-Díaz & Yúfera, 1997; Alexis *et al.*, 1999; Oliva-Teles, 2000; Koven *et al.*, 2001), o robalo *Dicentrarchus labrax* (L.) (*e.g.*, Alexis *et al.*, 1999; Oliva-Teles, 2000; Vagner *et al.*, 2007), a truta comum *Oncorhynchus mykiss* (Santigosa *et al.*, 2008; Trenzado *et al.*, 2007) e salmão (*e.g.*, Ershova *et al.*, 2004), a carpa comum *Cyprinus carpio* (L.) (*e.g.*, Carvalho *et al.*, 1997; Haniffa & Selvan, 1992; Gouillou-Coustans *et al.*, 1998; Steffens & Wirth, 2007), a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (*e.g.*, Köprücü & Özdemir, 2005; Drossou *et al.*, 2006), entre outros. Contrariamente, a investigação nesta área em espécies como o peixe-zebra, utilizadas exclusivamente em

investigação ou com fins ornamentais, tem sido bastante reduzida. Os aspectos nutricionais, necessários a uma optimização do seu cultivo estão, por isso, ainda longe de serem completamente conhecidos considerando, sobretudo, estudos a nível molecular. Contudo, o gradual aumento da popularidade do peixe-zebra como modelo de investigação (como revisto no capítulo 1.1.1.), tem obrigado a um esforço de investigação no sentido de determinar os parâmetros óptimos de crescimento, reprodução e manutenção da espécie em cativeiro (Lawrence, 2007; Westerfield, 2007). Torna-se, assim, importante a optimização da dieta no peixe-zebra, de modo a diminuir variabilidades associadas à alimentação, potencialmente detectáveis ao nível molecular.

1.2.1. A importância do alimento nas fases iniciais de desenvolvimento

As fases larvares e juvenis são as mais críticas no cultivo de peixes, devido à elevada vulnerabilidade dos indivíduos aos vários parâmetros de cultivo e, conseqüentemente, à ocorrência de elevadas mortalidades, e ainda à susceptibilidade de desenvolverem deformações que limitam o crescimento saudável (como revisto no capítulo 1.3.3.). É nestas fases, principalmente na fase larvar, que o alimento tem um papel fundamental e crítico. Uma dieta desadequada aos requisitos nutricionais das fases larvares, resulta não só numa diminuição do crescimento (*e.g.*, Carvalho *et al.*, 2006; Gaylord & Gatlin III, 2001; Bolliet *et al.*, 2000; Kim & Lee, 2004; Vagner *et al.*, 2007), como também numa interferência ao normal desenvolvimento dos peixes, contribuindo para a ocorrência de anomalias, nomeadamente deformações esqueléticas (Cahu *et al.*, 2003; Lall & Lewis-McCrea, 2007). Uma dieta apropriada para cada espécie é, então, essencial para a manutenção de peixes em cativeiro, de modo a promover um crescimento óptimo e uma ocorrência mínima de deformações. Isto traduzir-se-á numa melhor qualidade do peixe cultivado e, em última análise, num maior rendimento para o produtor (espécies comerciais) ou para o laboratório (espécies para fins de investigação científica, como é o caso do peixe-zebra).

A nutrição torna-se, assim, um alvo de estudo cuja importância tem vindo a acompanhar a expansão da indústria da aquacultura. O crescimento saudável das várias espécies de teleosteos cultivadas actualmente está, em grande parte, dependente da digestão, absorção, assimilação, transporte, metabolismo de determinados nutrientes que compõem o alimento e, principalmente, da composição nutritiva do mesmo (Cahu & Zambonino Infante, 2001).

As proteínas, os hidratos de carbono, as vitaminas, os minerais e os lípidos (tal como fosfolípidos e, especialmente, ácidos gordos essenciais) (Coutteau *et al.*, 1997; Rønnestad *et al.*, 1999; Yanong, 1999; Zambonino Infante & Cahu, 1999; Izquierdo *et al.*, 2000; Oliva-Teles, 2000; Roy & Lall, 2003; Tocher *et al.*, 2008) são nutrientes que regulam o desenvolvimento larvar dos peixes. O alimento deve ser, em termos de composição nutritiva, o mais específico e equilibrado quanto possível, de acordo com os requisitos de cada espécie. Tem havido ainda um esforço de investigação acrescido aquando do desmame de alimento vivo dos indivíduos de várias espécies, no sentido de otimizar a composição do alimento (bem como a idade mínima de desmame) e, conseqüentemente, reduzir o efeito da mudança de alimento na sua fisiologia (Opstad *et al.*, 2006, Alves Jr. *et al.*, 2006).

1.2.2. Alimento vivo versus alimento inerte

O cultivo de larvas e juvenis está ainda bastante dependente da disponibilidade de presas vivas como alimento (*e.g.*, Cahu & Zambonino Infante, 2001). Nauplius de *Artemia* (*e.g.*, Van Stappen, 1996; Sorgeloos *et al.*, 2001) e rotíferos *Brachionus sp.* (*e.g.*, Dhert, 1996) são os alimentos vivos mais frequentemente utilizados em maternidades. No caso do peixe-zebra, podem ser utilizadas paramécias vivas cultivadas como alimento inicial (Lawrence, 2007), sendo também utilizadas rações microparticuladas adoptadas para larvas, em substituição do alimento vivo.

Cahu & Zambonino Infante (2001) enumeram algumas características que deverão ser tidas em conta aquando da produção e utilização de dietas formuladas em aquacultura, tais como o tamanho das partículas, a sua distribuição na coluna de água e ingestão, digestão e qualidade nutritiva. A dificuldade em combinar estes factores, bem como a falta de conhecimento acerca dos requisitos nutritivos das espécies de peixes, tem levado à obtenção de resultados negativos com a utilização deste tipo de alimentos, relativamente aos obtidos com o uso de presas vivas nas fases larvares (Blair *et al.*, 2003). No que diz respeito ao peixe-zebra, não foi ainda determinado um regime alimentar com dietas comerciais que forneça resultados de crescimento e sobrevivência adequados (Goolish *et al.*, 1999; Carvalho *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos na maioria dos trabalhos mostram que existem ainda muitos aspectos por investigar, de modo a produzir dietas nutritivamente optimizadas, em particular para o peixe-zebra.

1.2.3. Alimento vivo

Apesar de o alimento composto não ser considerado ideal como primeiro alimento, as presas vivas apresentam também sérias limitações, inclusivamente ao nível nutricional. Deste modo, uma vez que a *Artemia* constitui um dos principais alimentos nas fases iniciais de crescimento, o esforço de investigação tem incidido sobre alguns dos seus aspectos nutritivos, sobre as suas propriedades enquanto presa viva para uso em aquacultura e sobre o modo como é utilizada quando consumida pelos peixes (*e.g.*, Morais *et al.*, 2004). A *Artemia* é um alimento pobre em determinados ácidos gordos, como o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e, especialmente, o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3) (Sorgeloos *et al.*, 2001), nutrientes bastante importantes para o desenvolvimento de peixes.

Os rotíferos (Rotifera) têm dimensões relativamente reduzidas que, associado ao facto de possuírem uma elevada taxa de reprodução, elevada tolerância a alterações ambientais e velocidade de natação reduzida, fazem deles uma boa presa para larvas de peixe (Dhert, 1996). Os rotíferos, tal como a *Artemia*, constituem um alimento pobre em determinados nutrientes, nomeadamente em EPA e DHA (Dhert *et al.*, 2001). Devido às carências nutritivas específicas referidas, diversas estratégias de enriquecimento nutricional têm sido aplicadas em *Artemia* (*e.g.*, Han *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2001; Monroig, 2006) e em rotíferos (*e.g.*, Ferreira *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2008), permitindo otimizar o crescimento de forma saudável e contribuir, conseqüentemente, para a qualidade dos animais em cativeiro. Contudo, este tipo de prática acarreta um aumento nos custos de produção e é pouco prática, na maioria das vezes. No caso dos rotíferos, a bio-encapsulação em microalgas (*e.g.*, *Tetraselmis sp.*, *Isochrysis sp.*, *Chlorella sp.*, *Nannochloropsis sp.*) da qual se alimentam pode constituir, por si só, um enriquecimento, uma vez que as larvas de peixe se alimentam indirectamente de uma fonte nutritiva rica (Dhert, 1996).

1.2.4. A digestão: o pâncreas exócrino e enzimas digestivas

A digestão dos nutrientes em peixes ocorre no tracto gastrointestinal através da acção das enzimas do estômago, intestino e pâncreas exócrino (Zambonino Infante & Cahu, 2001). O pâncreas é um órgão com forma lobular associado ao tracto digestivo que tem duas principais funções: produção de hormonas (componente endócrina) e libertação de enzimas para o lúmen intestinal (componente exócrina). Esta última é composta por glândulas que libertam enzimas digestivas, tais como glucosidases, lipases e proteases,

transportadas até ao intestino por uma rede de ductos (Zambonino Infante & Cahu, 2001; Slack, 1995; Junqueira & Carneiro, 2005; Yee *et al.*, 2005) e armazenadas em grânulos apicais de zimogénio, presentes nas células polarizadas das glândulas (Yee *et al.*, 2005).

A actividade e a expressão de determinadas enzimas digestivas secretadas pelo pâncreas tem apresentado crescente interesse, não só pelo facto de serem marcadores do desenvolvimento exócrino pancreático, mas também pelo facto de o alimento influenciar a sua actividade (Corring, 1980). A caracterização das enzimas digestivas de várias espécies de peixes (Chen *et al.*, 2006; Lazo *et al.*, 2007), tem contribuído para o conhecimento dos mecanismos de funcionamento do sistema digestivo e da influência que o alimento exerce sobre o mesmo e, conseqüentemente, sobre todo o desenvolvimento e crescimento dos indivíduos.

A tripsina é uma protease pancreática (tal como a quimotripsina) bastante bem caracterizada (Gráf & Szilágyi, 2003) estando, em mamíferos e peixes, associada ao pâncreas exócrino (Hjelmeland, 1995). A tripsina tem a propriedade de degradar proteínas em pequenos péptidos ou aminoácidos (Pratt & Cornely, 2004), hidrolisando as pontes peptídicas da extremidade do grupo carboxilo dos resíduos de arginina e lisina (Pearse, 1985; Hjelmeland, 1995). A sua actividade, em ciprinídeos, é directamente proporcional ao desenvolvimento do tracto digestivo, como mostra a figura 2 (Dabrowski, 1984). Em peixe-zebra, a sua expressão pode ser detectada, pela primeira vez, entre as 48 e as 72 horas pós-fertilização (hpf) (Biemar, 2001).

Tal como a tripsina, a amilase é uma enzima associada ao pâncreas exócrino e tem a função de quebrar moléculas de amido em polímeros de menores dimensões (Pratt & Cornely, 2004), estando também associada ao desenvolvimento do tracto digestivo (*e.g.*, Lundstedt *et al.*, 2004).

As enzimas digestivas, nomeadamente a tripsina e a amilase, devido ao facto de estarem associadas aos processos digestivos, têm sido utilizadas como marcadores do desenvolvimento do tracto digestivo e da qualidade do alimento (Lundstedt *et al.*, 2004; Kolkovski, 2001; Cahu *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Zambonino Infante & Cahu, 2001).

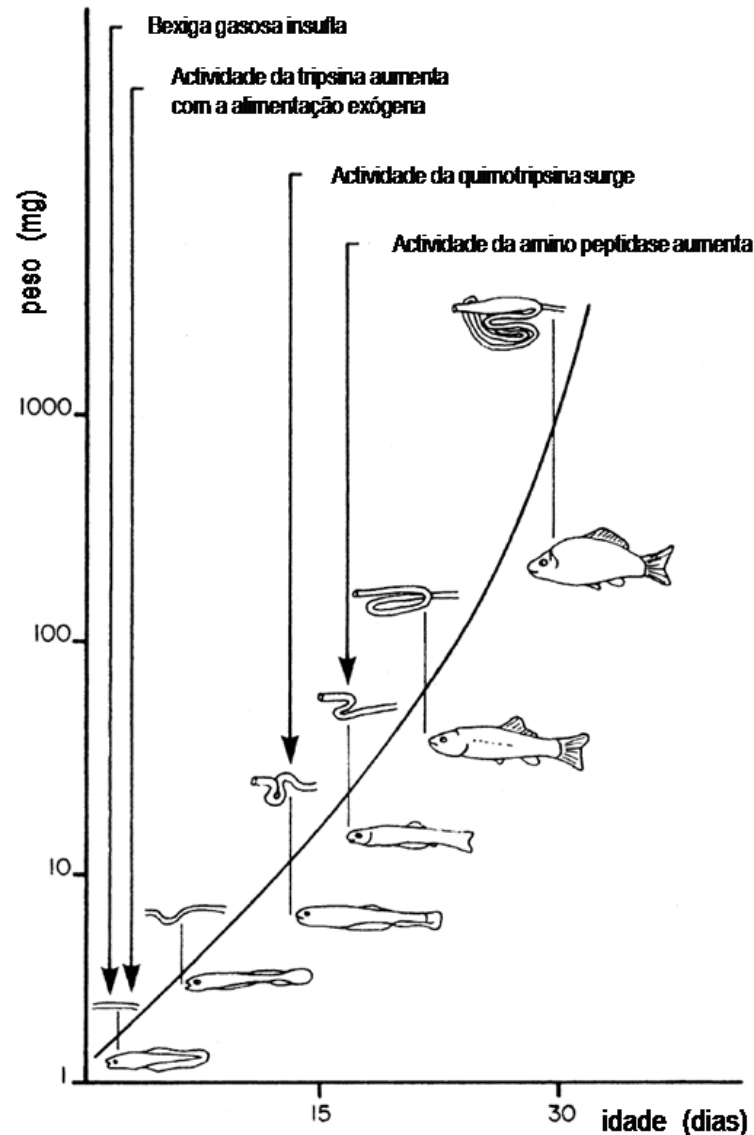


Figura 2: Desenvolvimento ontogénico do tracto digestivo de ciprinídeos (adaptado de Dabrowski, 1984)

1.3. O esqueleto: estrutura, função e ontogenia

O esqueleto é uma estrutura cujas origens chegam, provavelmente, a ter cerca de 750 milhões de anos (Hall, 2005). É composto por tecidos esqueléticos distintos, que vão desde o osso e cartilagem à dentina, esmalte e tecidos intermediários (cimento e enamelóide) (Hall, 2005; Hall & Witten, 2005). O osso e a cartilagem são os principais responsáveis pela formação dos elementos do endosqueleto dos vertebrados (*e.g.*, Karsenty, 1999, Olsen *et al.*, 2000).

O esqueleto dos vertebrados é composto por três linhagens embrionárias diferentes: esqueleto craniofacial, axial e dos membros. As células destas linhagens têm origem mesenquimal e migram para os locais do embrião, onde os elementos esqueléticos se

irão desenvolver, formar condensações mesenquimais de elevada densidade celular e diferenciar-se em osteoblastos ou condrócitos, as células características dos tecidos ósseo e cartilágneo, respectivamente (Olsen *et al.*, 2000).

O seu desenvolvimento é regulado por uma série de genes específicos como, por exemplo, factores de transcrição como Sox9 ou o Runx2 (Shum & Nuckolls, 2002), as proteínas morfogenéticas do osso (Bmp's), a proteína Gla da matriz (Mgp) e a osteocalcina (Oc), como é revisto no capítulo 1.3.4. Várias outras proteínas, como osteopontina e osteonectina (Hall & Witten, 2005), são bastante abundantes nos tecidos esqueléticos.

1.3.1. Estrutura do osso e processos de ossificação

O osso é um tecido esquelético vascularizado (Hall & Witten, 2005), constituído por células rodeadas por uma matriz mineralizada extracelular, no caso do osso celular, cujas principais funções se destinam ao suporte do corpo e à protecção de órgãos (cavidades craniana e torácica) nos vertebrados (Hall, 2005; Junqueira & Carneiro, 2005), existindo também um outro tipo de osso – o osso acelular, como no caso de algumas estruturas de alguns teleósteos (Witten *et al.*, 2004). É um tecido conectivo constituído por três principais tipos celulares: os osteoblastos, os osteoclastos e os osteócitos (*e.g.*, Karsenty, 1999; Hall, 2005; Junqueira & Carneiro, 2005; Gilbert, 2003). Uma das particularidades do osso reside nas funções destes tipos celulares. Ao passo que osteoblastos têm a função de depositar osso, os osteoclastos (normalmente multinucleados) são responsáveis pela modelação, remodelação e/ou remoção do osso (Hall, 2005; Teitelbaum, 2007; Karsenty, 1999). Os osteócitos são formados na sequência da evolução dos osteoblastos. Estes secretam matriz extracelular e quando envolvidos por ostóide não mineralizado ou osso mineralizado, passam a ser designados por osteócitos (Hall, 2005). A manutenção do osso ocorre, então, por um balanço entre a actividade das células responsáveis pela deposição de mineral e das responsáveis pela remoção (Karsenty, 1999; Hall & Witten, 2005). A figura 3 representa a estrutura celular do osso, evidenciando os tipos celulares acima descritos.

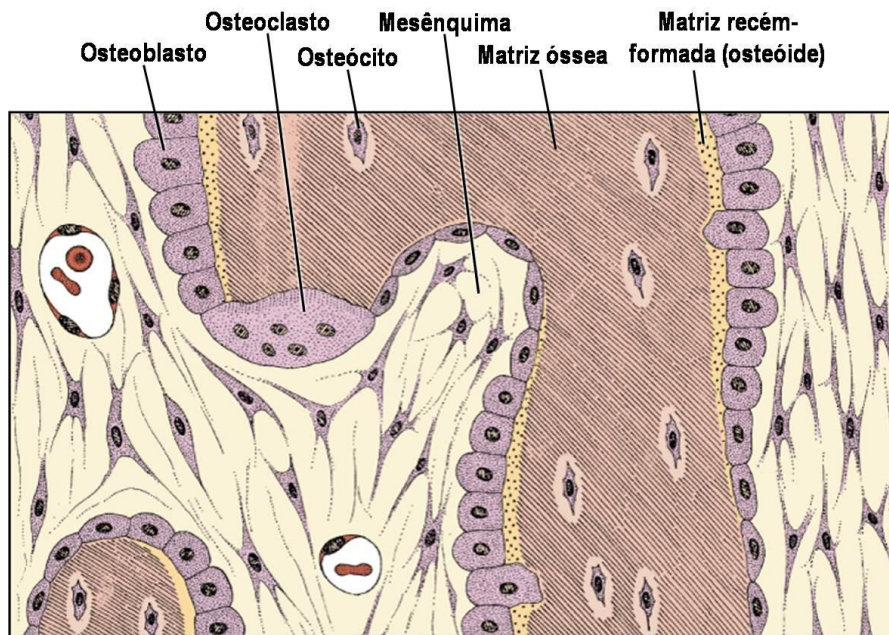


Figura 2: Estrutura celular do osso (adaptado de Junqueira & Carneiro, 2005).

O processo de ossificação ocorre segundo duas vias distintas. Desenvolve-se pela substituição de um modelo fibroso ou fibrocelular de células mesenquimais ou pela substituição de um modelo cartilágneo, formando osso intramembranoso ou endocondral, respectivamente (Hall, 2005, Olsen *et al.*, 2000 Gilbert, 2003). No caso da ossificação intramembranosa, as células mesenquimais formam condensações e diferenciam-se directamente em osteoblastos que produzem a matriz óssea; no caso da ossificação endocondral (figura 4), as células das condensações mesenquimais diferenciam-se em condrócitos (cuja estrutura é descrita à frente) que produzem cartilagem e, posteriormente, células da região pericondral diferenciar-se-ão em osteoblastos (Karsenty, 1999), levando à mineralização da cartilagem.

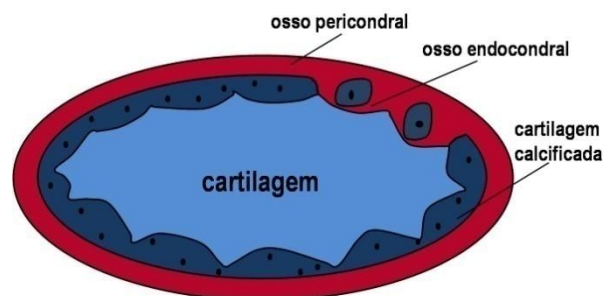


Figura 3: Processo de ossificação endocondral do endoesqueleto de vertebrados (adaptado de Hall, 2005).

1.3.2. Estrutura da cartilagem

A cartilagem (figura 5) é um tecido conectivo especializado, não vascularizado, com função de suporte e de articulação (*e.g.*, discos intervertebrais). Tal como osso, o tecido cartilágneo é constituído por células rodeadas por uma matriz extracelular, que pode ou não mineralizar dependendo do tipo de cartilagem (Hall, 2005). Esta é uma estrutura rica em água, contendo glucosaminoglicanos e proteoglicanos que interagem com o colagénio e fibras elásticas que dão uma consistência firme à matriz extracelular, conferindo resistência ao *stress* mecânico sem causar distorção permanente (Junqueira & Carneiro, 2005). Existem três tipos de cartilagens, que evoluíram como consequência dos vários requisitos funcionais: a cartilagem hialina, a mais comum, rica em colagénio do tipo II, a cartilagem elástica, abundante em fibras elásticas e a fibrocartilagem, rica em fibras de colagénio do tipo I (Benjamin, 1989a; Benjamin, 1989b; Benjamin, 1990; Benjamin *et al.*, 1992; Junqueira & Carneiro, 2005). Os tipos celulares predominantes na cartilagem são os condrócitos (Junqueira & Carneiro, 2005), cuja função é a manutenção e deposição do tecido. Existem ainda, de modo semelhante ao que ocorre no osso, tipos celulares que removem a cartilagem - os condroclastos – bem como, condroblastos (formadores de cartilagem, que vão diferenciar-se em condrócitos) (Hall, 2005). A rodear a cartilagem encontra-se um tecido conectivo, que forma uma interface entre a cartilagem e o tecido por esta suportado, a região pericondral. Esta região contém, ainda, a componente vascular necessária à cartilagem que é não vascularizada (Junqueira & Carneiro, 2005).

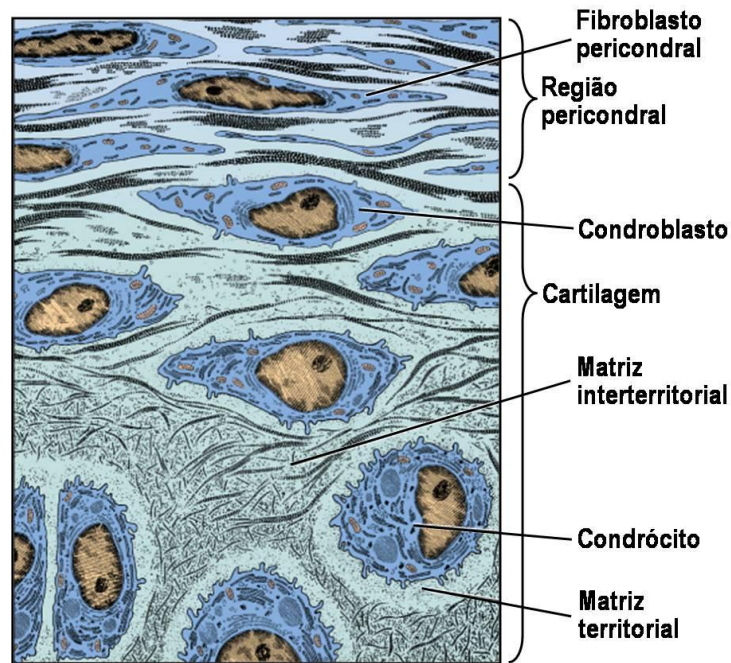


Figura 4: Estrutura celular do tecido cartilágneo (adaptado de Junqueira & Carneiro (2005)).

A cartilagem é um tecido de extrema importância no desenvolvimento do esqueleto de vertebrados, possuindo diversas funções pré e pós-natal, tal como o suporte estrutural do embrião e das fases iniciais de desenvolvimento, formação de modelos de ossificação endocondral, reparação de ossos fracturados e rápido desenvolvimento pós-natal do osso e das junções articulares (Shum & Nuckolls, 2002).

1.3.3. As deformações esqueléticas e o cultivo de peixes

Tal como os problemas de pigmentação e das escamas, o desenvolvimento de anomalias esqueléticas é um dos principais problemas com o qual a indústria da aquacultura se depara, contribuindo para a diminuição da qualidade, aumento da mortalidade (Koumoundouros *et al.*, 2002) e, em última análise, para a redução do potencial de produção de peixes. O estudo de anomalias esqueléticas em teleósteos demonstra também que estes vertebrados são bons modelos para o estudo de deformações esqueléticas em humanos (Gorman & Breden, 2007). As anomalias esqueléticas são muito diversificadas e podem ocorrer em várias regiões do esqueleto do peixe: desde a cabeça e estruturas associadas, como a mandíbula e o opérculo (Fraser & de Nys, 2005) à coluna vertebral e esqueleto caudal (Fjellidal *et al.*, 2007; Witten *et al.*, 2007; Gavaia *et al.*, 2006; Madsen & Dalsgaard, 1999) e barbatanas (Koumoundouros *et al.*, 1997). Boglione *et al.* (2001) mostraram a existência, em dourada, de uma

diferença bastante acentuada da frequência de malformações entre peixes cultivados e peixes selvagens capturados, em que os primeiros mostram uma frequência bastante superior. Na mesma espécie, foram obtidos resultados semelhantes, aquando da comparação de espécimes cultivados em diferentes regimes, apresentando maior incidência de anomalias esqueléticas em peixes cultivados num regime intensivo, comparando com um regime extensivo (Koumoundouros *et al.*, 1997). A ocorrência de deformações esqueléticas parece, então, estar intimamente relacionada com as condições de cultivo.

A ocorrência deste tipo de fenómenos, particularmente frequente nas fases larvares de desenvolvimento (Andrades *et al.*, 1996), está ligada a uma relação entre factores nutricionais, ambientais, genéticos e ainda fisiológicos e xenobióticos (Lall & Lewis-McCrea, 2007).

Apesar de a interacção entre estes factores e o desenvolvimento do esqueleto dos peixes ser ainda pouco conhecido, vários trabalhos têm sido desenvolvidos neste âmbito. Shikano *et al.* (2005), por exemplo, mostra claramente a existência de um efeito genético na ocorrência de malformações no Guppy, *Poecilia reticulata*, obtendo uma correlação negativa entre a taxa de deformações vertebrais e a heterozigotia. Por outro lado, Castro *et al.* (2008) sugerem que a ocorrência de deformações esqueléticas (lordose e ausência de opérculo) em dourada tem maior influência de factores ambientais que de factores genéticos. Dos factores ambientais destaca-se o efeito da temperatura, que parece ter uma correlação positiva com o aumento da frequência e severidade de deformações (lordose), como mostrou Sfakianakis *et al.* (2005) no robalo. O mesmo trabalho mostra, igualmente, o efeito da velocidade da corrente da água na frequência e severidade de deformações. Uma correlação positiva entre a temperatura e a incidência de malformações em *Pagellus erythrinus* (L.) foi também demonstrada por Sfakianakis *et al.* (2004).

A nutrição é um factor que tem, claramente, um efeito sobre o desenvolvimento deste tipo de anomalias, como foi demonstrado por Kamler *et al.* (2008), que verificaram claras diferenças entre o nível de deformações e a dieta no ciprinídeo *Scardinius erythrophthalmus* (L.). Peixes alimentados com uma dieta liofilizada formulada mostraram uma tendência superior de desenvolverem deformações esqueléticas, comparado com peixes alimentados com outros tipos de dietas (alimento vivo ou mistura). Outro exemplo é o descrito por Roy *et al.* (2002), que verificaram que os processos de formação de osso, mineralização e reabsorção são influenciados pela

composição dietética em fósforo. Vários nutrientes têm, assim, um papel importante no metabolismo do esqueleto, pelo que a composição do alimento terá, certamente, repercussões ao nível da sua formação. É importante destacar os nutrientes envolvidos no metabolismo do tecido esquelético: minerais, cálcio e fósforo, vitaminas (A, D, E, K e C), lípidos e proteínas. Este assunto foi detalhadamente revisto por Cahu *et al.* (2003) e por Lall & Lewis-MacCrea (2007).

1.3.4. As proteínas dependentes da vitamina K

Encontram-se, actualmente, descritas várias proteínas dependentes da vitamina K (PDVK) associadas ao osso e à homeostasia do cálcio e essenciais à coagulação sanguínea, como por exemplo factores de coagulação (*e.g.*, VII, IX e X), periostina, proteína C e proteína S (Dahlbäck, 1983; Dahlbäck *et al.*, 1986; Takahashi, 1986; Benzakour, 2008; Coutu *et al.*, 2008; Maillard *et al.*, 1992). A proteína S está também associada a tecido ósseo, uma vez que é sintetizada nos osteoblastos (Maillard *et al.*, 1992). As PDVK encontram-se, portanto, em vários tecidos nos vertebrados, nomeadamente no osso, onde se encontram duas proteínas Gla de extrema relevância, a proteína Gla da matriz (Mgp) e a osteocalcina (Oc ou proteína Gla do osso - Bgp), descritas em maior detalhe nas secções seguintes. Estas proteínas possuem uma relação evolutiva descrita por Laizé *et al.* (2005) e diversas características em comum.

A sua síntese é regulada, tanto ao nível de transcrição como de pós-transcrição e ambas sofrem um processamento pós-tradução, no qual resíduos de ácido glutâmico (Glu) são convertidos em ácido γ -carboxiglutâmico (Glu γ -carboxilados – Glas), através da γ -carboxilase que utiliza a energia da oxigenação da vitamina K (cofactor), num processo de γ -carboxilação. (Price *et al.*, 1987; Berkner, 2000; Berkner, 2005). Estes resíduos Gla têm a capacidade de se ligar a iões de cálcio, permitindo a regulação da deposição deste mineral por parte das proteínas Gla (Berkner, 2005).

1.3.4.1. Osteocalcina: descoberta, estrutura e função

A osteocalcina, a proteína não colagénica mais abundante no osso (Price *et al.*, 1982; Price *et al.*, 1976; Camarda *et al.*, 1987) e na dentina (Camarda *et al.*, 1987), foi purificada pela primeira vez a partir do osso de bovino por Price *et al.* (1976), mostrando ter um peso molecular de cerca de 6800 KD. A sequência peptídica mostrou que a proteína madura é composta por 50 aminoácidos (46-50, dependendo das espécies), sendo três dos quais resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico. Possui ainda uma

extensão de 49 resíduos na região N-terminal (figura 6), composta por um sinal peptídico hidrófobo e por um pró-peptídeo que é clivado após um dipéptido de arginina (Arg-Arg) (Pan & Price, 1985; Price *et al.*, 1976). O gene que codifica a Oc foi já clonado em várias espécies de vertebrados, como anfíbios *Xenopus laevis* (Viegas *et al.*, 2002, Cancela *et al.*, 1995, Dohi *et al.*, 2004), aves (Carr *et al.*, 1981; Laizé, 2005; Hauschka & Reid, 1978) e teleósteos (Pinto *et al.*, 2001, Laizé, 2005), em particular no peixe-zebra (Gavaia *et al.*, 2006). A sequência da proteína madura parece ser bastante homóloga entre espécies, excepto na sequência terminal (Pan & Price, 1985), sendo particularmente conservada entre humanos e peixes (Cancela *et al.*, 1995; Pinto *et al.*, 2001), o que faz dos teleósteos bons modelos para o estudo desta proteína.

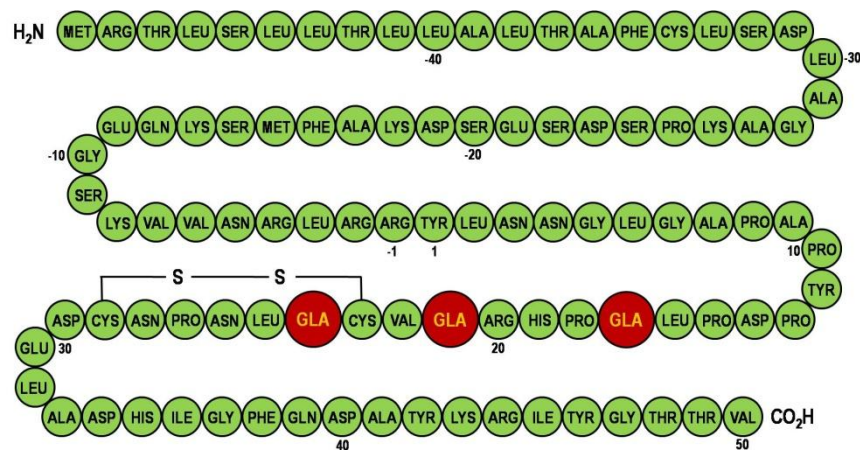


Figura 5: Sequência de aminoácidos da osteocalcina de bovino (pré-pro deduzida a partir da sequência de nucleótidos). A proteína madura inicia-se na posição 1 e o pró-peptídeo termina na posição -1. Os resíduos marcados a vermelho representam o ácido γ -carboxiglutâmico. A linha a sólido representa a ponte dissulfureto entre as cisteínas 23 e 29 (Cys₂₃ e Cys₂₉) (adaptado a partir de Pan & Price, 1985).

A Oc está principalmente associada a tecido conectivo calcificado (Price *et al.*, 1976), tendo estes autores verificado a sua presença em vértebra de teleósteos, osso de humano e dentina de bovino e a sua ausência em tecido cartilágneo. É, portanto, considerada, uma proteína específica de osso, apesar de ter sido já descrita a sua presença no plasma sanguíneo e no rim (Price & Nishimoto, 1980; Price *et al.*, 1981; Hauschka & Reid, 1978). Tem como principal propriedade o facto de se ligar fortemente à hidroxiapatite (Price *et al.*, 1976; Poser & Price, 1979), tendo uma importante função na regulação da cristalização desta substância. Para além de regular a cristalização da hidroxiapatite, a Oc parece ter também uma importante função no que diz respeito à qualidade do mineral depositado, sendo essencial para uma correcta maturação mineral do osso (Boskey *et al.*, 1998). Apesar de a função da Oc não ser

completamente conhecida, sabe-se que funciona como marcador de osteoblastos maduros, uma vez que está associada a estes tipos celulares (onde é expressa) (Boivin *et al.*, 1990; Sommer *et al.*, 1996), bem como a odontoblastos (DiMuzio *et al.*, 1983). Foi sugerido que poderia, ainda, desempenhar uma função no recrutamento de osteoclastos, por parte dos osteoblastos, através de um processo de quimioatração (Malone *et al.*, 1982), o que revela um papel bastante importante na regulação da deposição mineral no osso. Ducy *et al.* (1996) reforçaram esta ideia, num estudo no qual ratos deficientes em Oc desenvolveram um aumento na formação de osso sem a correspondente reabsorção de osso, demonstrando que a Oc é uma proteína determinante na manutenção do mineral no osso. Alguns trabalhos sugerem ainda uma associação da Oc a condrócitos hipertróficos (Neugebauer *et al.*, 1995, Strauss *et al.*, 1990; Gerstenfeld & Shapiro, 1996).

1.3.4.2. Proteína Gla da matriz: descoberta, estrutura e função

A proteína Gla da matriz (Mgp), uma proteína dependente da vitamina K com um peso molecular de cerca de 10 kDa, foi descoberta pela primeira vez por Price *et al.* em 1983, tendo sido purificada a partir de tecido ósseo desmineralizado de bovino (Price *et al.*, 1983; Price & Williamson, 1985). Foi feito um posterior esforço no sentido de identificar e purificar esta proteína, bem como de clonar o gene que codifica para a mesma, noutras espécies de vertebrados, tal como em anfíbios (Cancela *et al.*, 2001), aves (Wiedemann *et al.*, 1998, Laizé *et al.*, 2005), peixes cartilagíneos (Ortiz-Delgado *et al.*, 2006, Laizé *et al.*, 2005) e teleósteos, como no caso do peixe-zebra e da dourada (Pinto *et al.*, 2003; Gavaia *et al.*, 2006, Simes *et al.*, 2003, Laizé *et al.*, 2005). No seguimento desta descoberta foi possível determinar que a proteína madura é composta por 84 aminoácidos (19 correspondem ao péptido sinal), dos quais 5 são resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico (Price *et al.*, 1987). A figura 7 mostra a estrutura molecular da proteína madura de humano. A Mgp tem a capacidade de se ligar a iões minerais a partir dos resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico (Price *et al.*, 1987). Uma característica interessante da Mgp é o facto de esta não possuir um pró-péptido, como as outras proteínas dependentes da vitamina K, sendo a sequência de reconhecimento da γ -carboxilase mantida no interior da proteína madura, o que demonstra que a γ -carboxilação e a secreção de proteínas dependentes de vitamina K não está, necessariamente, associada à presença de um pró-péptido ou à sua remoção proteolítica (Price *et al.*, 1987).

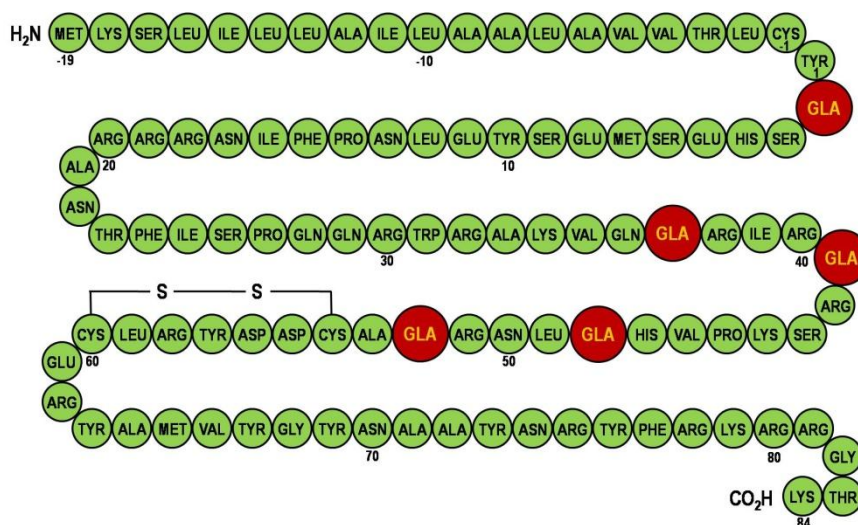


Figura 6: Sequência de aminoácidos da proteína Gla da matriz (humano). A vermelho estão marcados os resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico e as linhas sólidas representam as pontes dissulfureto entre as Cys₅₄ e Cys₆₀. Os números negativos correspondem ao pré-peptídeo e a proteína madura começa na posição 1 (adaptado de Cancela *et al.*, 1990).

A Mgp está presente na matriz orgânica da cartilagem e do osso *in vivo*, mas é principalmente característica da cartilagem, uma vez que tem sido descrita a sua associação a este tecido, tal como em zonas de crescimento de placas cartilagueiras (Loeser *et al.*, 1992; Hale *et al.*, 1988; El-Maadawy, 2003). Em peixe-zebra e dourada acumula-se tanto no tecido calcificado como nas paredes não-mineralizadas dos vasos do sistema vascular (Pinto *et al.*, 2003; Gavaia *et al.*, 2006).

A Mgp é predominantemente expressa por células do músculo lisovascular (Wallin *et al.*, 1999; Shanahan *et al.*, 1993) e por condrócitos. Em mamíferos é também expressa no tecido pulmonar, cardíaco e no rim (Fraser & Price, 1988). Assume um papel particularmente importante no processo de mineralização, uma vez que regula negativamente o processo de deposição mineral, controlando o grau de mineralização tanto ao nível da cartilagem como do osso (Yagami *et al.*, 1999). Estes autores mostraram que o *knockdown* da Mgp com varfarina (um inibidor da γ -carboxilação – Price & Williamson, 1985) e a sua sobre-expressão resultam num aumento da mineralização do osso e numa diminuição da mineralização dos condrócitos, respectivamente. Está também descrita a associação da Mgp a tecido vascular (Jono *et al.*, 2006; Shanahan *et al.*, 1993; Moe *et al.*, 2005; Proudfoot & Shanahan, 2006), desempenhando um papel relevante no processo de inibição da calcificação ectópica de vasos sanguíneos.

A Mgp é, então, um bom marcador do desenvolvimento do esqueleto, nomeadamente do desenvolvimento cartilágneo.

II. OBJECTIVOS

Tendo em conta o aumento da popularidade do peixe-zebra enquanto modelo vertebrado na investigação, torna-se fundamental determinar os parâmetros óptimos de crescimento da espécie em cativeiro, nomeadamente aqueles relacionados com a nutrição, de modo a determinar um regime alimentar adequado e padronizado.

O objectivo principal deste trabalho centrou-se, então, na determinação do efeito da dieta no desenvolvimento esquelético e do tracto digestivo do peixe-zebra ao nível tecidual, celular e molecular, com o uso de ferramentas histológicas e moleculares, em associação à determinação dos parâmetros de sobrevivência e crescimento, através da avaliação de quatro dietas distintas (alimento vivo, alimento vivo seguido de alimento inerte, mistura de alimento vivo e inerte – consistindo o alimento vivo em rotíferos e/ou nauplii de *Artemia*). Deste modo, espera-se contribuir para o estabelecimento de uma dieta optimizada, passível de ser utilizada como dieta padrão pelos vários biotérios de cultivo de peixe-zebra.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reprodução e manutenção de ovos e larvas

Foram obtidas larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*) através da incubação de ovos fertilizados provenientes de um mesmo lote de reprodutores, previamente seleccionado, tendo em conta a qualidade das posturas anteriores. Os ovos foram seleccionados de forma aleatória dos diferentes conjuntos de reprodutores, de modo a obter o tamanho das amostras pretendido. Cada conjunto de reprodutores encontrava-se na proporção de 2 fêmeas : 1 macho (4 fêmeas e 2 machos). No período nocturno anterior ao dia da postura os reprodutores foram mantidos em aquários de 5l, ficando as fêmeas e os machos isolados fisicamente em caixas, através de redes. Durante o período matinal do dia da postura removeram-se as redes dos reprodutores, promovendo o contacto directo entre os peixes e a consequente fertilização. Os embriões foram removidos por aspiração e mantidos em aquários com cerca de 900 ml de água livre de iões pesados proveniente de um sistema de osmose inversa. A água foi mantida a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e renovada na totalidade diariamente, sendo adicionadas cerca de 3 a 5 gotas (0.1 – 0.2 ml) de 0.001 % azul de metileno, de modo a evitar contaminações por fungos, até aos 3 dias pós-fertilização (dpf), altura em que os embriões tinham já eclodido. Os parâmetros de cultivo foram baseados nos descritos por Lawrence (2007).

3.2. Desenho experimental

Do grupo (*pool*) previamente seleccionado (capítulo 3.1.), as larvas foram mantidas, dos 5 aos 14 dias dpf, em aquários contendo cerca de 900 ml de água a 28°C (± 1), tendo sido posteriormente transferidas para aquários de 3l num sistema de recirculação de água, aos 15 dpf, com um fluxo médio de $7200 \text{ cm}^3 \text{ h}^{-1}$ (início dos tratamentos) a $22500 \text{ cm}^3 \text{ h}^{-1}$ (final dos tratamentos), onde se mantiveram até ao final dos tratamentos (figura 8). Ao 5º dpf, quando as larvas sobem à superfície e começam a procurar alimento (Lawrence 2007; Westerfield, 2007), deu-se início à oferta do alimento, de acordo com as dietas abaixo descritas (figura 9). Foram levados a cabo 4 tratamentos, cada um correspondente a uma dieta específica, cujas doses diárias de alimento foram divididas em três alimentações (10, 13, e $17\text{h} \pm 0.5\text{h}$). As dietas experimentais foram divididas em: rotíferos *Brachionus sp.* dos 5 aos 15 dpf e nauplius de *Artemia* dos 16 aos 45 dpf – R-A; nauplius de *Artemia* dos 5 aos 45 dpf – A-A; nauplius *Artemia* dos 5 aos 15 dpf e Cyclop-eeze™ dos 16 aos 45 dpf – A-C; mistura dos vários alimentos, nauplius *Artemia*

e rotíferos *Brachionus sp.* dos 5 aos 15 dpf e nauplius *Artemia*, Cyclop-eeze™ e ração floculada (Benelux_{NV}) dos 16 aos 45 dpf – MIX (tabela II). Os rotíferos *Brachionus sp.* foram enriquecidos com microalga *Tetraselmis suecica*. As doses diárias de alimento foram as seguintes: 3-4 nauplius *Artemia*/ml/dia até aos 15 dpf e 4-6 nauplius *Artemia*/ml/dia dos 16 aos 45 dpf (aumentos graduais na dose diária, ao longo dos tratamentos), 12 rotíferos/ml/dia e 75mg/aquário/dia (em aquários de 1 l) e 300mg/aquário/dia (em aquários de 3 l) de Cyclop-eeze™. A dieta MIX consistiu na oferta de alimento *ad libitum*.

Toda a água utilizada foi água proveniente do sistema maturado de recirculação com água livre de iões pesados produzida num sistema de osmose inversa. Foi aplicado um fotoperíodo artificial (14 h luz : 10 h escuridão), tal como sugerido por Westerfield (2007). Para cada tratamento foram efectuados quadruplicados de 200 larvas, resultando num total de (200×4) larvas × 4 tratamentos = 3200 larvas. O quarto replicado teve apenas como finalidade a amostragem de exemplares em caso de elevadas mortalidades nos restantes replicados.



Figura 8: Sistema de recirculação de água de cultivo de peixe-zebra utilizado, onde se mantiveram os espécimes dos 15 aos 45 dpf. No canto encontra-se representada uma caixa com um volume de cerca de 900ml de água, onde se mantiveram as larvas dos 5 aos 15 dpf.

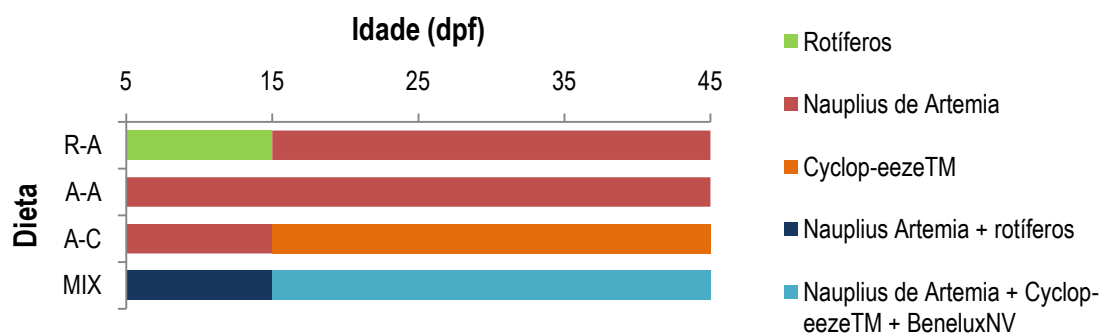


Figura 9: Representação dos tratamentos usados e respectiva informação dos regimes dietéticos.

Tabela III: Composição nutritiva relativa das várias dietas utilizadas. SI = sem informação disponível. Os dados foram obtidos a partir do peso seco. a) Dhont & Van Stappen (2003), b) Lubzens & Zmora (2003); c) e d) dados obtidos a partir dos fabricantes.

	Nauplius de Artemia ^(a)	Rotíferos	Cyclop-eeze ^{TM(c)}	Benelux ^{NV(d)}
Proteínas	41.6-61.9%	28-63% ^(b)	62%	45%
Lípidos	14.4-23.1%	9-28% ^(b)	36%	4%
Hidratos de carbono	3.6-10.6%	10.5-27% ^(b)	3%	5%
20:5n3 (EPA)	3.5-8.9mg g ⁻¹ ps (0.35% -0.89%)	0.04-0.29% ^(b)	34.99 mg g ⁻¹ (3.5%)	SI
22:6n3 (DHA)	vestígios	0.01-0.11% ^(b)	33.05 mg g ⁻¹ (3.31%)	SI

Os parâmetros da qualidade da água (% saturação de oxigénio, temperatura, pH, nitritos, nitratos e amónia) foram determinados com regularidade (4 em 4 dias) ou sempre que se verificaram elevadas taxas de mortalidade, de modo a despistar valores de mortalidade devidos a parâmetros não adequados ao cultivo da espécie. Diariamente foi efectuada uma renovação de 70% da água nos aquários de 1l (até aos 15 dpf) e as larvas mortas, bem como os restos de alimentos e fezes, foram removidas por sifonação. No sistema de recirculação de água, efectuou-se renovação de 30% do volume total de água semanalmente.

3.3. Amostragem

Aos 15, 30 e 45 dpf procedeu-se à amostragem de um grupo de 90 indivíduos para posteriores tratamentos e análises. Os exemplares foram anestesiados e sacrificados com uma sobredose de Tricaine (MS-222 ou sal 3-aminobenzoato metanosulfonato, C₉H₁₁NO₂.CH₄O₃S, Sigma) e fixados em 4% paraformaldeído (PFA –, Sigma)

tamponado com PBS-DEPC, durante 24hrs a 4°C antes de serem desidratados e mantidos em metanol a -20°C, com lavagens gradativas de 5 min (100% PBS, 75% PBS + 25% MeOH, 50% PBS + 50% MeOH, 25% PBS + 75% MeOH, 100% MeOH). Algumas amostras, utilizadas para determinação de anomalias esqueléticas por coloração do esqueleto, foram mantidas em 4% paraformaldeído até utilização. Foram ainda amostrados exemplares para análise de expressão genética. Neste caso, os indivíduos foram sacrificados com uma sobredose do anestésico referido e colocados em solução D, de modo a preservar o RNA, como é pormenorizadamente explicado no capítulo 3.7.1.

3.4. Cultivo de alimento vivo

Para pôr em prática os tratamentos previstos no desenho experimental, foi necessário cultivar cadeias acessórias: nauplius de *Artemia* e rotíferos *Brachionus sp.*. O cultivo destes alimentos em aquacultura é bastante comum, pelo que os parâmetros óptimos estão já bem descritos (Dhert, 1996; Van Stappen, 1996).

Para a obtenção de nauplius de *Artemia* foi utilizado um *stock* de cistos EG de um lote da INVETM, Belgium. Diariamente foram preparados dois litros de água a 32 ppt e 29°C, com arejamento constante onde foram colocados 2 g de cistos de *Artemia* a incubar, entre 17-24hrs. Após eclosão dos nauplius, estes foram filtrados por um crivo de 150 µm e lavados com água corrente. Foram então passados para água doce o mínimo de tempo até à alimentação das larvas de *D. rerio*. Foi ainda mantido, diariamente, um *stock* de 1l de cistos de *Artemia* (1 g) colocados a incubar no período da tarde nas mesmas condições, de modo a poder administrar nauplius recém eclodidos às larvas na última alimentação diária, evitando a passagem para a fase Instar I, cujas reservas nutritivas são mais escassas.

Foram cultivadas duas espécies de rotíferos (*B. plicatilis* e *B. rotundiformis*) e, para a sua manutenção foi necessário o cultivo de microalga *Tetraselmis suecica* (Clone Tchuii) para enriquecimento. Foi preparada uma manga plástica com cerca de 40 l de água a 30 ppt, em constante arejamento e num ambiente com clima controlado e luminosidade constante. A água da manga foi desinfetada com 1 ml hipoclorito de sódio / 1 água (40 ml hipoclorito de sódio) durante 24 hrs e posteriormente neutralizada com a mesma quantidade de hipossulfito de sódio durante 2 hrs com arejamento forte. Adicionou-se meio de Walne (1 ml nitratos, fosfatos e metais / 5 l água (8 ml de cada) e 0.1 ml vitaminas / 5 l água, a partir de soluções *stock*) e um inóculo inicial de microalga

em fase exponencial de crescimento previamente mantido. Quando em fase exponencial de crescimento o cultivo foi distribuído por recipientes de 5l aos quais foi adicionado um inóculo de uma população previamente mantida de *Brachionus sp.*, com uma densidade de cerca de 500 rots/ml. A população de *Brachionus sp.* foi filtrada por um crivo de 55 µm e transferida para novo cultivo de microalga sempre que o crescimento do cultivo inicial de microalga se encontrava na fase de declínio. A determinação da densidade de *T. suecica* foi possível com o uso do hematocitómetro de Burker por observação ao microscópio óptico. A densidade de *Brachionus sp.* foi determinada pela contagem do número de rotíferos em 1ml (1:100 do *stock* original) sob uma lupa binocular.

3.5. Determinação da mortalidade e crescimento

A mortalidade foi determinada diariamente, pela contagem de larvas mortas ao final de cada dia. O crescimento foi avaliado pela determinação do comprimento total (CT), comprimento padrão (CP) e da largura da boca (LB) de 15 larvas e juvenis recolhidos aos 15, 30 e 45 dpf (figura 10). Nas primeiras fases foi utilizada uma lupa Leica MZ6 com escala graduada e medição à décima de mm. Nas fases mais avançadas optou por se utilizar uma régua milimétrica para a determinação de CT e CP (excepto para a largura da boca). Foram ainda determinadas as razões entre CP e CT (CP/CT) e entre LB e CT (LB/CT). Foram ainda determinadas as taxas específicas de crescimento (SGR) total e da boca, a partir dos dados de comprimento total e da largura da boca obtidos anteriormente. Dada a impossibilidade de medir os mesmos exemplares em todas as amostragens foram considerados os dados das amostragens aleatórias efectuadas. Para a obtenção das SGR foi utilizada a seguinte equação (Hopkins, 1992), utilizada por vários autores (Pérez-Jimenez *et al.*, 2007; Shan *et al.*, 2008):

$$SGR = \left(\frac{\ln(L_t) - \ln(L_0)}{t} \right) \times 100$$

onde L_t é a medida final do peixe (comprimento total ou largura da boca) ao tempo t , L_0 é a medida inicial (aos 4 dpf) e t é o período de tempo entre L_0 e L_t em dias.

Os dados de crescimento obtidos foram submetidos a análise estatística, pelo método de Student-Newman-Keuls de comparação de grupos, utilizando o software SigmaStat 3.5.

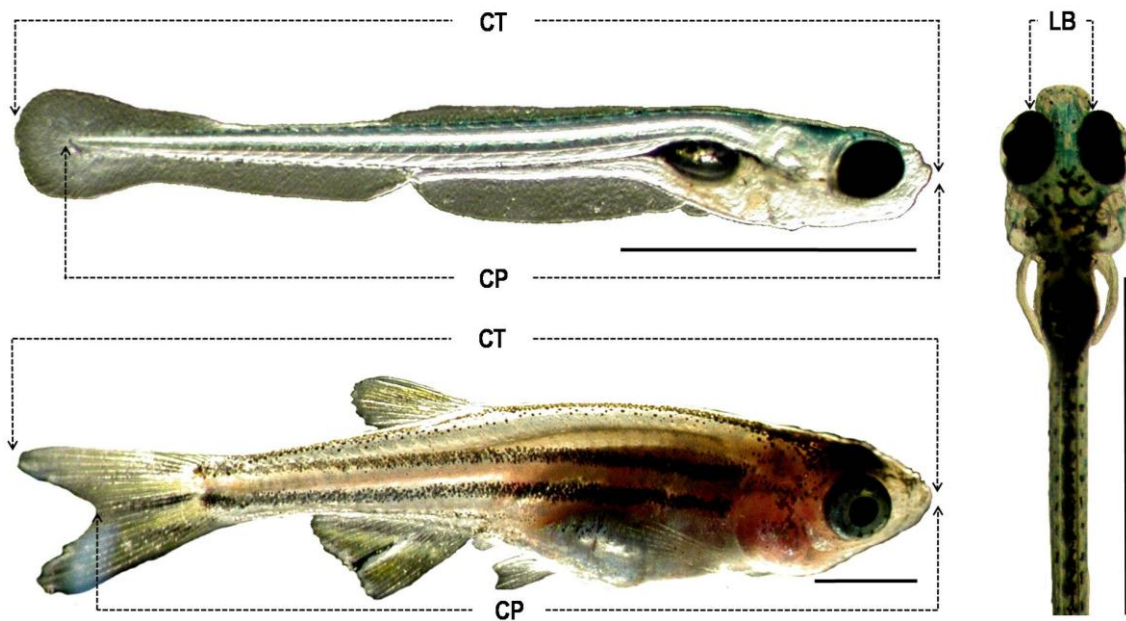


Figura 10: Medidas utilizadas na determinação do comprimento total (CT) e padrão (CP) de peixes com a barbatana caudal não desenvolvida (horizontal topo) e com a barbatana caudal desenvolvida (horizontal base) e largura da boca (LB). As barras de escala representam 1.5 mm.

3.6. Análise de estados de mineralização e de anomalias esqueléticas

Foi analisada a componente óssea do esqueleto de 5 exemplares por amostragem por tratamento, através da coloração do osso com vermelho de alizarin. Os espécimes foram sujeitos a um processo de fixação, desidratação e preservação (como descrito no capítulo 3.3.), coloração do osso com vermelho de alizarin S (C.I. 58005, Sigma), maceração e clareamento final em KOH e finalmente preservação em glicerol.

A fixação foi efectuada em 4% PFA e antes da aplicação do protocolo de coloração, as amostras mantidas em MeOH foram rehidratadas com passos graduais de PBS + EtOH. Procedeu-se, então, à coloração do osso com vermelho de alizarin S (adição de solução *stock* de vermelho de alizarin S a 1% KOH até atingir uma cor de roxo escuro – aproximadamente uma diluição de 1:50 da solução *stock* de vermelho de alizarin S em 1% KOH). As amostras foram mantidas na solução de coloração de vermelho de alizarin S entre 30 min a 72 hrs, até completa coloração do osso. O clareamento final foi efectuado pela incubação dos espécimes em 1% KOH a temperatura ambiente e, larvas que começavam a perder a sua rigidez, foram mantidas em 25% glicerol 1% KOH, evitando a degradação da amostra. Os espécimes corados e clareados foram preservados em glicerol, por sucessivos banhos gradativos de 0.5% KOH (ou água destilada, no caso de as larvas se encontrarem já transparentes) + glicerol (3:1; 1:1; 1:3; glicerol absoluto).

A duração dos banhos depende do tempo que o glicerol demora a penetrar no tecido (normalmente as amostras estão prontas quando afundam), como descreve Gavaia *et al.* (2000). Neste caso, foram aplicados tempos de 5 min em cada banho.

Os espécimes foram observados com uma lupa binocular Leica MZ6. Foi determinado o estado de mineralização de otólitos, arcos branquiais, cleitrum, vértebras e arcos, hipurais e pterigóforos, de modo a inferir acerca do estado de desenvolvimento dos elementos esqueléticos. Foram consideradas estas estruturas, devido a mineralizarem cedo durante o desenvolvimento e, por isso, constituírem estruturas marcadoras do desenvolvimento global do esqueleto, como anteriormente realizado (Gavaia *et al.*, 2006). Foi considerada, em cada grupo, a máxima frequência (mineralizado ou não mineralizado) observada. Foi avaliado o número médio de vértebras mineralizadas. Foi determinada a taxa de ocorrência de malformações com a ajuda de uma escala alfa-numérica pré-estabelecida, onde estão representadas as malformações e a região de ocorrência (tabela III), de acordo com as malformações observadas, tal como realizado em trabalhos levados a cabo com outros teleósteos (Boglione *et al.*, 2001; Boglione *et al.*, 2003; Favalaro e Mazzola, 2000; Favalaro e Mazzola, 2003).

Tabela III: Escala alfa-numérica na qual estão representadas as estruturas e as categorias de correspondentes malformações.

Estruturas	Malformações
A. Vértebras	1. Deformação
B. Parapófises	2. Fusão
C. Arcos (neurais e hemais)	3. Vacuolização
D. Costelas	4. Supranumerário
E. Hipurais, epurais e parhipurais	

3.7. Análise da expressão genética

3.7.1. Extração do RNA total dos tecidos

A extração de RNA (figura 11) é um passo fundamental para se avaliar a expressão de um determinado gene. Este procedimento visa extrair o RNA total do tecido para posteriormente se isolar e/ou quantificar o RNA mensageiro (mRNA) do gene em questão. A extração de RNA é um processo que necessita de bastantes cuidados, uma vez que as moléculas de RNA são facilmente degradadas por RNases, presentes endogenamente nas células, bem como exogenamente, pelo que o uso constante de gelo

e soluções estéreis sem RNase (entre outros) é uma prática obrigatória quando se trabalha com RNA (Rapley, 2000a). Neste trabalho, a técnica consistiu numa adaptação do método de Chomczynski e Sacchi (1987). De cada tratamento foi recolhido um número de exemplares suficiente (que variou entre 15 larvas e 2 indivíduos juvenis-adultos) para a obtenção de uma quantidade significativa de RNA, após a sua extração. Os espécimes foram anestesiados com Tricaine e colocados em tubos de 2 ml contendo 500 µl de solução D (Guanidina isotiocianato + β-mercaptoetanol), um forte detergente inibidor de RNases e desnaturante de proteínas (Rapley, 2000a), para cerca de 50 mg de tecido. De seguida, procedeu-se à maceração e trituração das amostras com seringas e agulhas 23G (20G e 18G para espécimes de maiores dimensões – peixes de maiores dimensões foram previamente cortados), homogeneizando o tecido e promovendo a lise celular, bem como a quebra das moléculas de DNA genómico que, devido ao seu tamanho são susceptíveis à destruição mecânica (Rapley, 2000a). A cada amostra foram adicionados 50 µl de NaOAc 2M pH4.0 de modo a garantir a estabilidade do pH durante a extração, 500µl de fenol (ácido – pH4.3±0.2) para separar RNA de outros componentes celulares (*e.g.*, DNA) e 100µl de clorofórmio:isoamil 49:1 (preparado de fresco). Entre a adição de cada um dos reagentes, misturou-se o conteúdo das amostras por inversão e, após a adição do último, agitou-se vigorosamente com a mão durante 15 segundos, sendo este um passo crítico para uma eficaz extração do RNA. As amostras foram mantidas em gelo durante 15 min e centrifugadas a 10.000g durante 15 min a 4°C para separação de fases. Após extração da fase aquosa (fase em que o RNA se encontra eluído) e descarte da fase fenólica (onde o DNA e restos de outros componentes celulares se encontram) (figura 11) adicionou-se 1 Vol de isopropanol e deixou-se precipitar o RNA a -20°C O/N. Centrifugou-se a 10.000g durante 30 min a 4°C e descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi novamente ressuscitado em solução D e transferido para tubos *ependorf* de 1.5ml. Adicionou-se mais 1 Vol de isopropanol para promover nova purificação das amostras de RNA, deixou-se precipitar a -20°C (a precipitação decorreu O/N, de modo a otimizar a extração) e centrifugou-se a velocidade máxima durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado, o *pellet* lavado com 1ml de EtOH-DEPC 70% (de modo a remover moléculas de pequenas dimensões), com o uso do vórtex e centrifugado a velocidade máxima durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e deixou-se o precipitado contendo o RNA secar ao ar. Este foi, então, eluído em H₂O-MilliQ e armazenado a -80°C.

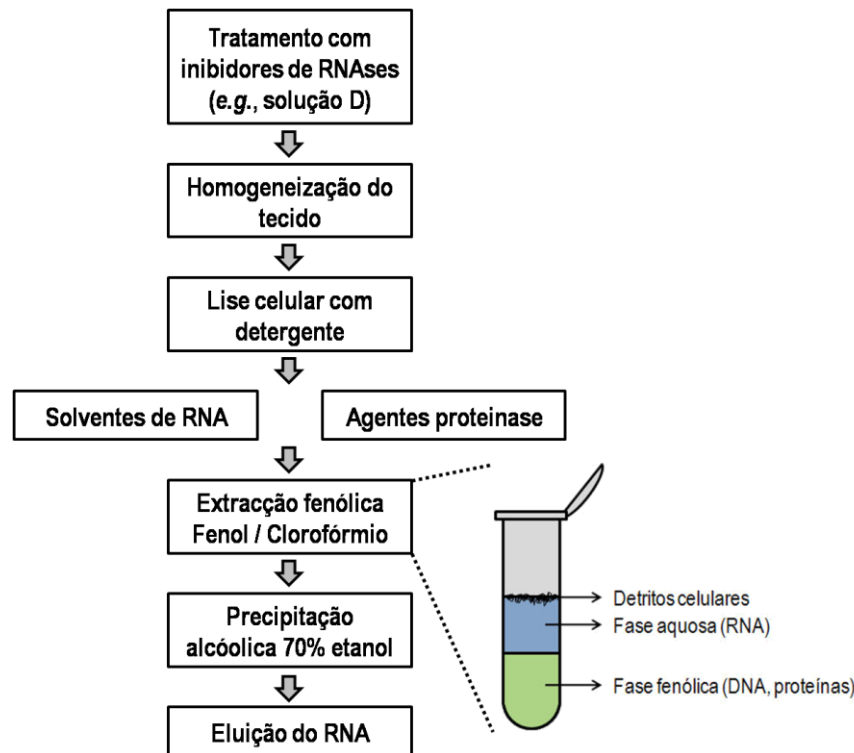


Figura 11: Esquema base do princípio de extração de RNA de tecidos (adaptado de Rapley (2000a)).

3.7.2. Electroforese de RNA em gel de agarose com formaldeído

Foi realizada uma electroforese de RNA, de modo a confirmar uma extração eficaz do RNA dos tecidos e a integridade do mesmo. Uma vez que o RNA é composto por moléculas bastante reactivas e, conseqüentemente, bastante instáveis e degradáveis, não é aconselhável fazer uma electroforese num convencional gel de agarose, pelo que se utiliza um gel de agarose com formaldeído.

Foi então feito um gel de 1.4% agarose 3% formaldeído em H₂O-DEPC (para evitar contaminações com RNases) com tampão MOPS. O gel correu durante cerca de 10 min antes da corrida das amostras. As amostras de RNA foram incubadas a 65°C durante 10min para desnaturação e diluídas numa solução de 50% formamida, 17.5% formaldeído em H₂O-DEPC com MOPS. Foi adicionado brometo de etídio (1:20) directamente às amostras, e corante (para ver a frente de corrida) antes de estas serem carregadas no gel. As amostras correram durante cerca de 15 min a 120 V e o gel foi observado usando o transiluminador Bio-Rad GelDoc2000 e o software Quantity One 4.6. Foi avaliada a qualidade de RNA pela determinação da integridade das bandas das subunidades ribossomais observadas no gel.

3.7.3. Análise da quantidade de RNA

O RNA extraído das amostras foi, então, sujeito a análise de quantidade. Estas foram avaliadas por espectroscopia, usando o equipamento GeneQuant (Pharmacia Biotech). Foi emitido um espectro de 260nm (gama a que os ácidos nucleicos possuem maior absorvância). A quantidade foi avaliada pela determinação da concentração (em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), pela fórmula $40 \times \text{Abs}_{260} = [\text{RNA}] (\mu\text{g}/\text{ml})$. Foi ainda determinado o grau de pureza das amostras (em %), pela razão $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$, que corresponde a 2 quando a amostra é considerada pura. A 280nm é detectada a absorvância (Abs_{280}) das proteínas, pelo que, deste modo, é subtraída a quantidade de proteínas detectada.

3.7.4. Digestão do DNA com DNase

Após a extracção de RNA, algumas moléculas de DNA continuam presentes nas amostras. Como é necessário obter uma amostra de RNA o mais pura possível, a digestão com DNase é um passo fundamental. Para a digestão do DNA, adicionou-se às amostras um volume de enzima DNase (RQ1, Promega) e de tampão (1 μl DNase, 1 μl tampão, 1 μl amostra de RNA, 7 μl H₂O-DEPC) e promoveu-se todo o processo, deixando a enzima actuar durante 30 min a 37°C, segundo as condições descritas pelo fabricante. Adicionou-se 1 μl de solução Stop (RQ1 DNase Stop, Promega) que actuou durante 10 min a 65°C, de modo inactivar a DNase e terminar a reacção.

3.7.5. Transcrição inversa de mRNA (RT-PCR)

Ao ser constituído por cadeias simples, o RNA é uma molécula instável e, portanto, facilmente degradável. Deste modo, é comum, em biologia molecular, acoplar à reacção em cadeia da polimerase (PCR) a técnica da transcrição inversa de mRNA (RT-PCR) (figura 12) que se baseia no uso de uma enzima, a transcriptase inversa (RT), com o objectivo de produzir moléculas de DNA complementar (cDNA) aos transcritos de mRNA de interesse.

Para cada amostra foi utilizado 1 μg de RNA total colocado na presença de oligonucleótidos (dNTP's – 2 μl), da enzima transcriptase inversa MMLV-RT (100 U) (0.2 μl) e do inibidor de RNases RNase Out (20 U) (0.5 μl), ambos da Invitrogen, através das indicações do fabricante. Foi ainda adicionado DTT (Ditiotreitol – 2 μl) para desnaturação do DNA, 5x 1st Strand-buffer (SB – 4 μl) e o *primer* dT-Adapter (1 μl). A transcrição inversa foi iniciada com o *primer* dT-Adapter composto por uma sequência de timinas seguido de uma sequência adaptadora (adaptador de oligo-dT). A presença

de uma cauda de poliadeninas no mRNA permite a hibridação da sequência de timinas do *primer*. Usando o termociclador TRIO-Thermoblock (Biometra), as misturas foram mantidas a 60°C durante 3 min para desnaturação do RNA antes da adição da enzima e do inibidor de RNases. As amostras foram, de seguida, mantidas a 37°C durante 1 hr para promover a transcrição. Por fim as enzimas foram neutralizadas a 95°C durante 5 min. A figura 4 resume o processo de RT-PCR como realizado neste trabalho.

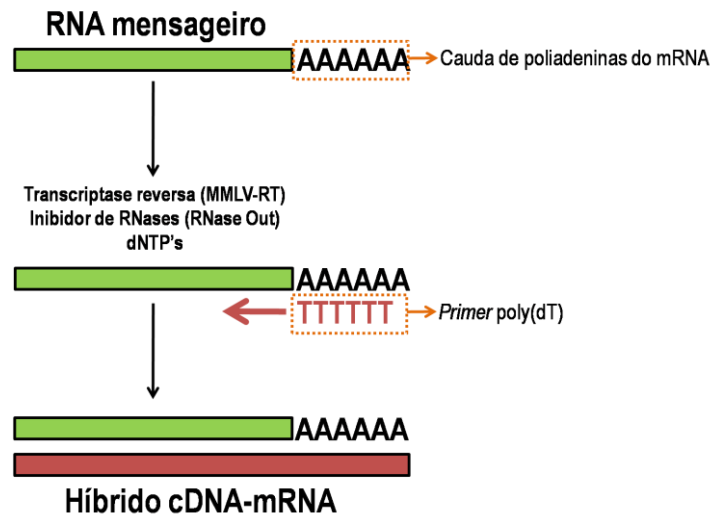


Figura 12: Esquematisação base da reacção de RT-PCR, como efectuado no presente trabalho (adaptado de Rapley *et al.*, 2000b).

3.7.5. Quantificação relativa da expressão genética por PCR em Tempo Real

A quantificação relativa da expressão genética permite determinar a quantidade relativa de transcritos do gene de interesse (mRNA) presente numa amostra considerando como referência uma amostra controlo. A expressão relativa é determinada em função da expressão simultânea de um gene “housekeeping” padrão (HK), que é teoricamente constante. O princípio básico baseia-se na técnica de PCR, no qual as amostras são sujeitas a ciclos de temperatura, permitindo que uma enzima (polimerase) amplifique o cDNA. Simultaneamente são incorporadas moléculas fluorescentes nas cadeias duplas de cDNA, permitindo detectar a fluorescência em tempo real e, conseqüentemente, determinar a quantidade de transcritos, em cada ciclo de amplificação (figura 13A). Durante a amplificação são consideradas quatro fases: a fase basal, em que os níveis de fluorescência se mantêm como valores de fundo, a fase recém-exponencial, a fase exponencial, em que o produto de PCR duplica após cada ciclo e a fase *plateau*, quando a reacção é limitada pelos elementos essenciais à mesma (Wong & Medrano, 2005). É, computacionalmente calculada uma linha de base

(*baseline*) (figura 13A), que permite determinar o ciclo de *threshold* (ciclo no qual a curva de amplificação cruza a linha de base) e, subsequentemente, os níveis relativos de expressão. É ainda calculada a curva de desnaturação (figura 13B), de modo a verificar a existência de produtos de amplificação secundários, através da sua temperatura de desnaturação específica.

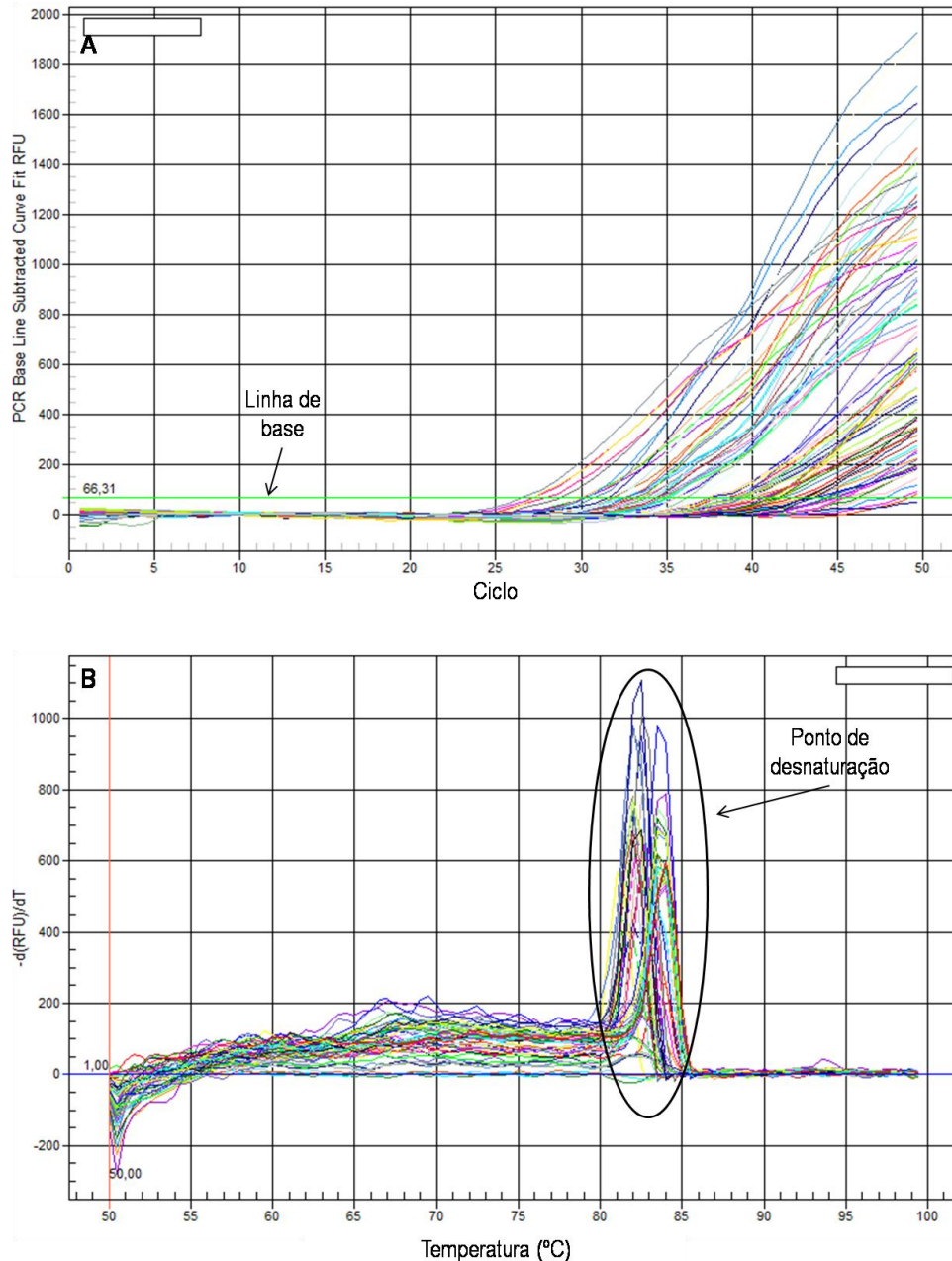


Figura 13: Representação gráfica obtida a partir da análise de PCR em Tempo Real. A) representa a informação relativa à amplificação em cada ciclo: cada curva representa a amplificação de uma dada amostra, a verde horizontal está representada a linha de *threshold*; B) representa a curva de desnaturação: cada curva é referente a uma determinada amostra.

Neste trabalho foi utilizado o fluoróforo verde SYBR Green, uma cianina com elevada afinidade para o DNA de cadeia dupla. Para cada amostra, foi efectuada uma mistura inicial para a reacção, composta por 10µl de mix SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) (fluoróforo), 2µl do cDNA (1:10) resultante da RT-PCR, 0.2µl de cada um dos *primers* específicos (anexo 1) para os genes de interesse (*mgp*, *oc*, *amilase* e *tripsina*) e para o gene HK *elongation factor 1a* (*ef1a* – Tang *et al.*, 2007), responsável pela normalização dos resultados e H₂O-DEPC para completar os 20µl finais para a reacção. As sequências dos genes supracitados encontram-se disponíveis na base de dados do GenBank com os seguintes códigos de acesso: *mgp* – AY072811; *oc* – NM_001083857; *amilase* – NM_213011.1; *tripsina* – NM_131708.1; *ef1a* – NM_131263. Foi utilizado o cDNA de exemplares com 4 dpf não alimentados, como amostra controlo. Os *primers*, desenhados com o software PrimerPremier 5.0, foram obtidos da Sigma Genosys. As misturas foram colocadas em placas de PCR (ABgene, Thermo Scientific), específicas para este tipo de análise, que foram inseridas no sistema de detecção de PCR em tempo real iCycler iQ (Bio-Rad). As amostras sofreram processos de activação enzimática, desnaturação das cadeias duplas de cDNA e de extensão, através do programa descrito na tabela IV. A determinação dos níveis de expressão foi efectuada em triplicados. Os dados foram analisados com o software iQ[™]5 2.0 (Bio-Rad).

Tabela IV: Programa de amplificação por PCR em Tempo Real utilizado. Estão representados os tempos e temperaturas em cada ciclo e são explicados os processos que ocorrem em cada ciclo. *Aumentos graduais de 0.5°C dos 50 aos 100°C em ciclos de 10 s.

	CICLO 1		CICLO 2		CICLO 3
	Passo 1	Passo 1	Passo 2	Passo 2	Passo 1
Repetições	1×		60×		100×
Temperatura (°C)	95	95	68		50 - 100 (+0.5°C)*
Tempo	13:30	00:20	00:15		00:10
Processo	Activação da polimerase (desnaturação do anticorpo e libertação da enzima)	Desnaturação das cadeias duplas	Hibridação dos <i>primers</i> e extensão		Determinação da curva de desnaturação

Foi efectuada uma recta de calibração, com base em quatro diluições em escala logarítmica dos produtos de uma das RTs previamente efectuadas (1, 1:10, 1:100, 1:1000), o que permitiu calcular a eficiência da amplificação.

3.7.6. Electroforese em gel de agarose

Foi efectuada uma electroforese a 120V em gel de agarose 2% (para obter uma boa separação dos produtos amplificados), com os produtos do PCR em Tempo Real, para confirmar se ocorreu amplificação de cDNA. A cada um dos produtos de PCR foi adicionado 1µl de corante (Takara). Foram então pipetados 20 µl para cada um dos poços do gel. O princípio da técnica baseia-se na carga do DNA que, por ser negativa, promove a migração do DNA para o ânodo, quando é aplicada uma diferença de potencial eléctrico. Deste modo, a velocidade de migração dos fragmentos de DNA é inversamente proporcional ao seu tamanho. Através de um marcador de tamanho molecular (100bp ladder, Fermentas) foi possível estimar o tamanho dos fragmentos e verificar a correcta amplificação do fragmento esperado, usando o transiluminador Bio-Rad GelDoc2000 e o software Quantity One 4.6.

3.8. Preparação de secções histológicas

3.8.1. Inclusão das amostras em parafina

Para as obtenção de secções em parafina, os espécimes conservados em metanol e rehidratados, sofreram um processo de descalcificação em PFA 4% EDTA 10% de modo a retirar o mineral e, assim, obter secções completas e não danificadas após o corte. As amostras foram novamente preservadas em metanol (como descrito no capítulo 3.3.). Posteriormente, foram manualmente incluídas em parafina, tendo-se aplicado os seguintes banhos, com duração de 90 min cada: 1:1 metanol:xilol para uma gradual impregnação de xilol nos tecidos, 100 % xilol 1, 100% xilol 2, parafina 1 (solúvel em xilol) e, finalmente, parafina 2 (para uma completa saturação e impregnação de parafina nos tecidos). Devido às reduzidas dimensões das larvas, optou por se utilizar uma parafina (Merck) com um ponto de fusão (52-54°C) inferior às normalmente utilizadas em histologia, evitando, assim, a redução do tamanho das amostras e a perda excessiva de componentes lipídicos que causa um aumento da rigidez das amostras e a obtenção de secções de menor qualidade. Os blocos de parafina contendo as amostras foram efectuados num processador Microm HMP 110.

3.8.2. Corte das amostras em secções

Foram, então, feitas secções de 7-9 µm, com orientação rostro-caudal. As secções foram preparadas num micrótomo HM 340 E (Microm), colocadas a flutuar na

superfície de água estéril tratada com DEPC a 52°C e, finalmente, recolhidas em lâminas tratadas com TESP (3-aminopropiltrietoxilisano, Sigma), o qual confere uma maior adesão às secções por parte das lâminas. De seguida, estas foram secas a 37°C e armazenadas a 4°C até posterior utilização. As secções de cada peixe foram sequencialmente distribuídas por séries de cinco lâminas, como é representado na figura 14.

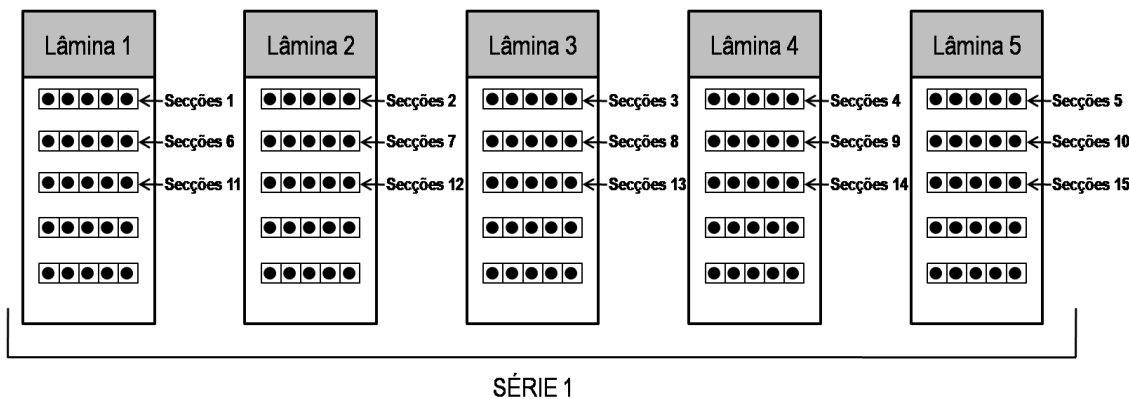


Figura 14: Distribuição sequencial das secções pelas lâminas.

3.8.3. Desparafinação

Antes da utilização das secções para todo o tipo de análise posterior, estas foram sujeitas a um processo desparafinação. Foi, então, aplicado um processo de banhos graduais: 2 × 10 min 100 % xilol (xilol 1 e 2) para remoção da parafina e, uma vez que o xilol não dilui em água, uma série de banhos de 6 min com etanol para hidratação das amostras (etanol 100%, 70%, 50% diluído em H₂O-DEPC e H₂O-DEPC).

3.9. Demonstração da fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP) em secções

A fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP) é uma enzima histologicamente associada a osteoclastos e, conseqüentemente, à reabsorção da matriz óssea (Burstone, 1959; Minkin *et al.*, 1982; Hayman *et al.*, 1996), pelo que é considerada um bom marcador da actividade osteoclástica. Esta técnica consiste, assim, na demonstração da TRAP, permitindo localizar zonas de remoção óssea no tecido, como é mostrado na figura 15. Este processo é promovido pela adição de um substrato, o naftol AS-TR fosfato (N-AS-TR-P) e de um marcador, a pararosanilina (PRS – C.I. 42500, Sigma) hexazotizada. Quando o fosfato presente no substrato é degradado pela TRAP endógena, a PRS hexazotizada adquire uma coloração avermelhada, revelando a localização da enzima.

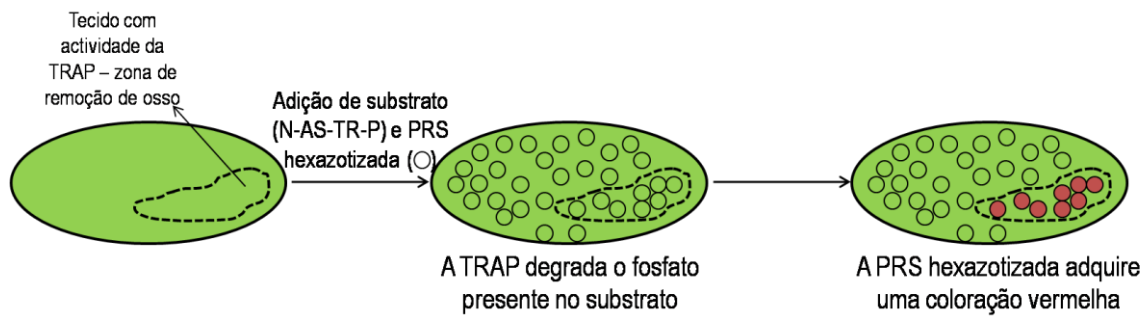


Figura 15: Esquemática do processo de localização de regiões de remoção de osso pela demonstração da TRAP no tecido.

As secções foram saturadas em 0.1M tampão acetato + 50 mM tartrato disódio desidratado a pH 5.5. Foram adicionados 2 ml 4% NaNO_2 a 1ml de solução de PRS a temperatura ambiente para promover a sua hexazotização. Foi preparado o meio de incubação (30 ml 0.1M tampão acetato + 50 mM tartrato disódio a pH 5.5, 1 ml PRS hexazotizada, 600 μl 2% MgCl_2 , 2 ml substrato enzimático – 2 mg N-AS-TR-P em 2ml N,N-dimetilformamida). Uma vez que é uma reacção sensível à luz, as secções foram mantidas no meio de incubação no escuro, durante 2-3 hrs ou até revelação do sinal, tendo sido posteriormente lavadas em $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$, de modo a parar a reacção.

Foram lavadas em $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$, montadas no meio de montagem aquoso AquatexTM e secas O/N. Foi feito o registo fotográfico, usando o microscópio de inversão BX-81 (Olympus, Japan) e o equipamento fotográfico C-3030 ZOOM (Olympus).

3.10. Imunolocalização de Oc e Mgp em secções

Esta é uma análise que tem como objectivo a localização de uma determinada proteína no tecido (figura 16). Baseia-se na reacção antigene-anticorpo (Holme & Peck, 1998) e tem como princípio básico o dos ensaios enzimáticos, com a grande diferença de que reconhece enzimas artificiais. São utilizados anticorpos específicos, obtidos do antisoro de animais (*e.g.*, coelho ou rato) injectados com a proteína em questão (antigene), aos quais se irá ligar um anticorpo secundário (*e.g.*, anti-*rabbit* ou anti-*mouse*) marcado (Holme & Peck, 1998; Boenish, 2001), no caso, com uma peroxidase (Nakane & Pierce Jr., 1966; Nakane & Kawaoi, 1974). A peroxidase degrada um cromogéneo (no caso, 3'3'-diaminobenzidina tetrahydrocloro – DAB) que promove a formação de um precipitado de cor acastanhada. É ainda utilizado peróxido de hidrogénio (H_2O_2 – substrato natural da peroxidase) que irá competir com o DAB,

resultando numa diminuição do efeito de *background* (acumulação de precipitado em regiões não específicas).

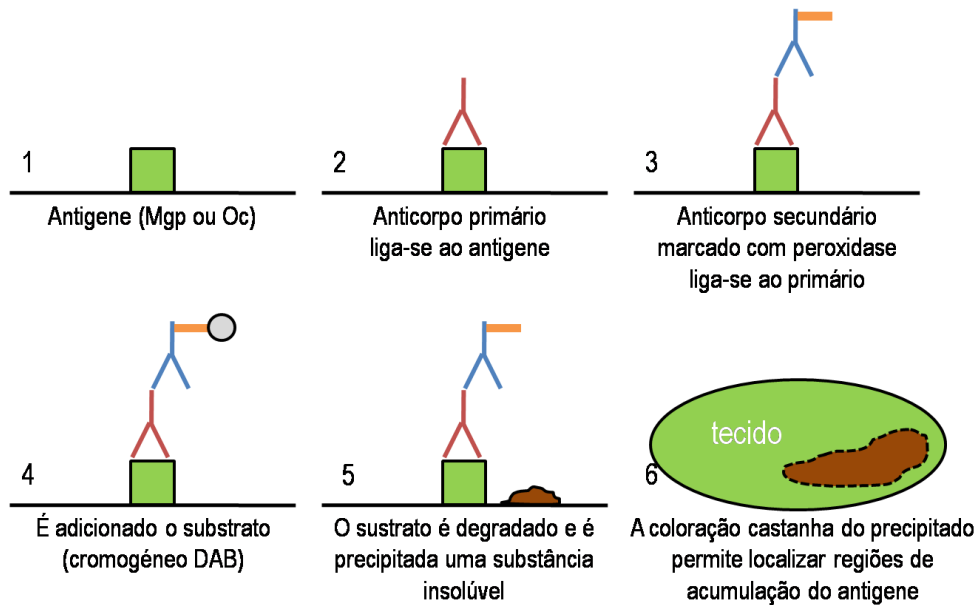


Figura 16: Esquemática do processo de imunolocalização de Mgp e Oc nos tecidos, evidenciando os vários passos da técnica ao nível molecular.

Após desparafinação das lâminas, as secções foram incubadas numa solução de 3% peróxido de hidrogénio (H_2O_2) durante 15 min, de modo a bloquear as peroxidases endógenas do tecido. Esta reacção é sensível à luz, pelo que foi efectuada no escuro. As secções foram então submetidas a 3 banhos de 5 min em tampão TCT e, posteriormente, incubadas em TCT + 0.5% albumina de soro de bovino (BSA) durante 30 min, para impregnação do tecido em proteína. Foram adicionados os anticorpos primários contra Mgp e Oc (1:150 em TCT + 0.5% BSA) que actuaram durante a noite, em câmara húmida. Neste trabalho foram utilizados os anticorpos policlonais desenvolvidos contra a Mgp e a Oc de corvina, *Argyrosomus regius*, validados por Simes *et al.* (2004) para outros teleósteos, incluindo o peixe-zebra, obtidos da Strategic BioSolutions (Ramona, CA, USA). Foram consideradas, ainda, duas amostras controlo: uma relativa ao efeito do soro pré-imune (soro sem anticorpo), de modo a determinar o efeito de fundo, e um segundo relativo ao efeito do segundo anticorpo. Ao primeiro adicionou-se soro pré-imune (1:150 em TCT + 0.5 % BSA) e ao segundo apenas TCT + 0.5% BSA. As secções foram, então, lavadas 3×15 min em TCT. Foram, de seguida, incubadas com o segundo anticorpo (anti-IgG-peroxidase anti-*rabbit*) – excepto a lâmina relativa ao segundo controlo –, que actuou durante 2 hrs, em câmara húmida. Foram submetidas a duas lavagens de 10 min em TCT e a uma lavagem de 10 min em tampão de revelação

(0.05M Tris HCl pH 7.6), que forneceu os sais necessários à posterior reacção de revelação de sinal. As lâminas foram, de seguida, incubadas numa solução de DAB (que funcionou como substrato, para revelação da actividade da peroxidase), filtrado por um filtro com poro de 0.45µm (Sarstedt), à qual foi adicionado H₂O₂ (para diminuição da peroxidase). As secções foram mantidas nesta solução entre 5-10 min (até surgimento de sinal específico). A reacção foi terminada pela lavagem das secções em H₂O_{dd}. Posteriormente, as lâminas húmidas foram montadas com o meio de montagem aquoso AquatexTM e secas O/N. Foi feito o registo fotográfico, usando o microscópio de inversão BX-81 (Olympus, Japan) e o equipamento fotográfico C-3030 ZOOM (Olympus). A composição das soluções utilizadas encontra-se no anexo 2.

3.11. Caracterização histológica

3.11.1. Coloração com hematoxilina

A hematoxilina tem elevada afinidade para elementos celulares com pH caracteristicamente ácido, como núcleos e outras estruturas ácidas (Ross *et al.*, 2003). Quando oxidada, forma o composto realmente corante, a hemateína, que possui uma cor arroxeada. A hematoxilina de Harris, especificamente, possui óxido de mercúrio como agente químico oxidante, de modo a produzir a hemateína. Esta, por si só, não tem elevada afinidade para os tecidos e é inadequada como corante nuclear sem a presença de um mordante (sais dos metais alumínio, ferro e tungsténio). A combinação com iões metálicos (presentes na água corrente) maximiza, assim, a sua capacidade de tingimento e permite uma boa diferenciação visual dos tecidos (Ross *et al.*, 2003).

As secções desparafinadas e hidratadas foram mergulhadas em água destilada e coradas durante 4 min com uma solução de 50% hematoxilina de Harris (C.I. 75290, Sigma-Aldrich). Foram, de seguida, lavadas durante 3 min em água corrente para diferenciar a coloração nos diferentes tecidos.

3.11.2. Desidratação e montagem

As secções coradas foram desidratadas com banhos graduais de 6 min: (etanol 50%, 70%, 100% e xilol 100%) e montadas em EUKITT[®] (Merck) (tabela 3).

3.12. Registo fotográfico

O registo fotográfico foi feito com o equipamento C-3030 ZOOM (Olympus), usando o microscópio de inversão BX-81 (Olympus, Japan) para secções e a lupa MZ6 (Leica) para indivíduos inteiros.

IV. RESULTADOS

4.1. Mortalidade e crescimento

Para cada uma das dietas testadas foi efectuado o registo dos níveis de mortalidade nos três replicados, em amostras de 200 indivíduos, de modo a estudar eventuais divergências neste parâmetro. De um modo geral, em todos os tratamentos se verificou um pico de mortalidade entre os 10 e os 14 dpf (figura 17). Existiram claras diferenças deste parâmetro entre tratamentos, sendo R-A a dieta que apresentou uma mortalidade superior aos 15 dpf (cerca de 90%). É importante destacar que esta elevada mortalidade impediu a continuação do tratamento e a consequente passagem para nauplius de *Artemia* como alimento (como previsto). A dieta MIX foi a que apresentou valores de mortalidade mais reduzidos (~8% no final do tratamento) e as dietas A-A e A-C mantiveram mortalidades semelhantes ao longo de todo o tratamento, atingindo valores intermédios comparativamente aos restantes tratamentos (~61 e 55 %, respectivamente, no final dos tratamentos).

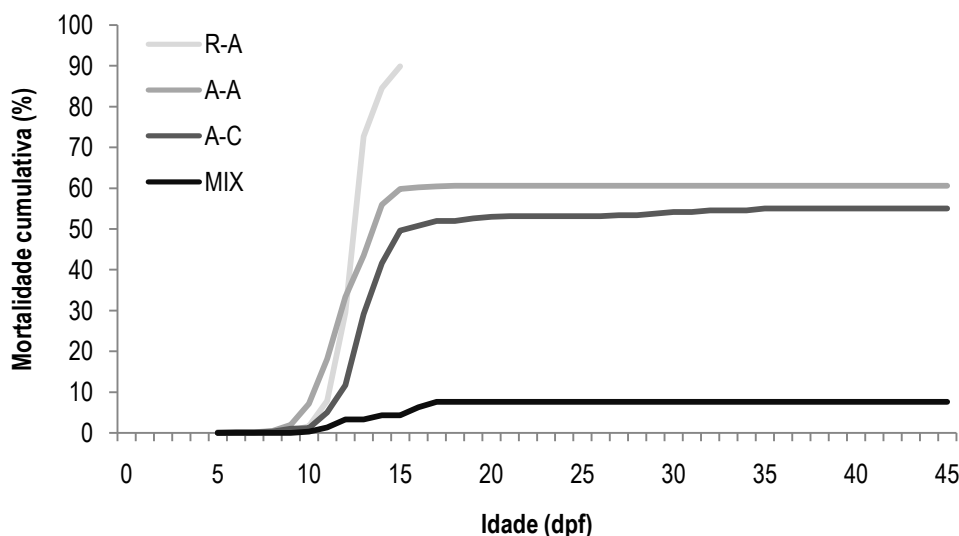


Figura 17: Mortalidade cumulativa média de três replicados para cada dieta (n=200).

Considerando os dados de biometria que permitem avaliar o efeito da dieta ao nível do crescimento, verificaram-se diferenças evidentes nos comprimentos entre tratamentos. R-A foi a dieta que apresentou comprimentos significativamente inferiores aos 15 dpf ($p < 0.05$) (figuras 18 e 19), excepto no que diz respeito à largura da boca comparativamente à dieta MIX (figura 20). A-A e A-C não apresentaram diferenças

significativas ($p < 0.05$) nesta idade, relativamente a todas as medidas efectuadas. Aos 30 dpf, a dieta A-A apresentou o maior comprimento ($p < 0.05$) seguida da dieta MIX. Nesta altura verificou-se já uma ligeira diferença ($p < 0.05$) na dieta A-C, apresentando o comprimento mais reduzido das dietas testadas. Esta diferença foi mais acentuada aos 45 dpf, tendo A-C apresentado os comprimentos significativamente menores ($p < 0.05$). A-A e MIX apresentaram comprimentos total e padrão significativamente semelhantes nesta idade, contudo, a largura da boca mostrou ser superior em A-A que em MIX.

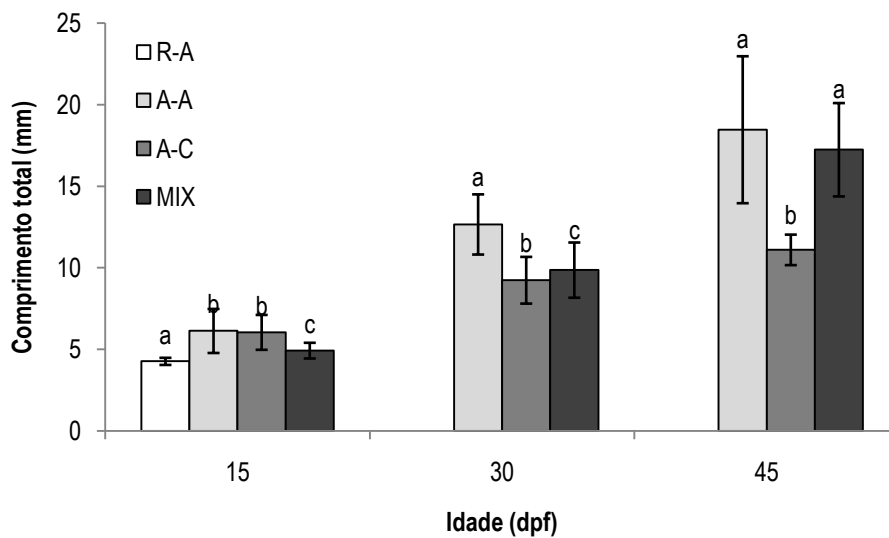


Figura 18: Comprimento total médio dos peixes dos vários tratamentos aos 15, 30 e 45 dpf. A significância foi testada pelo método de Student-Newman-Keuls: $n=15$, $p < 0.05$.

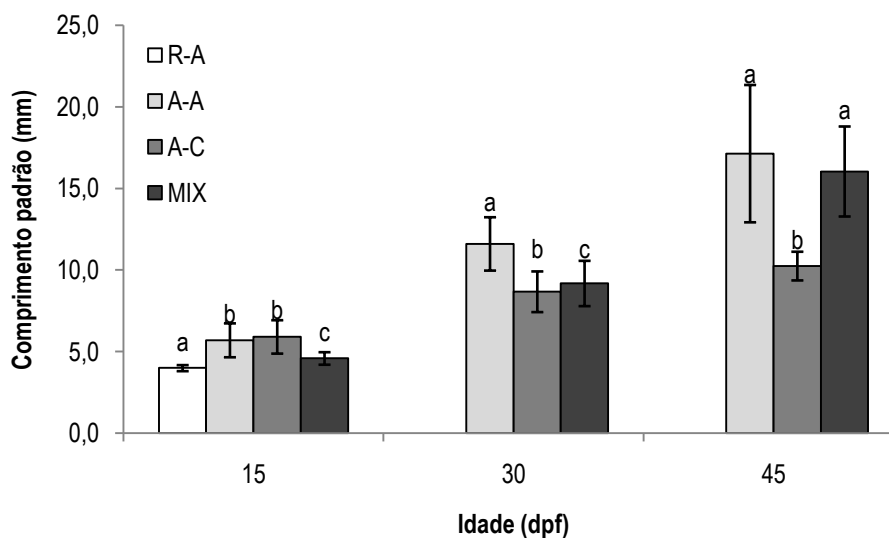


Figura 19: Comprimento padrão médio dos peixes dos vários tratamentos aos 15, 30 e 45 dpf. A significância foi testada pelo método de Student-Newman-Keuls: $n=15$, $p < 0.05$.

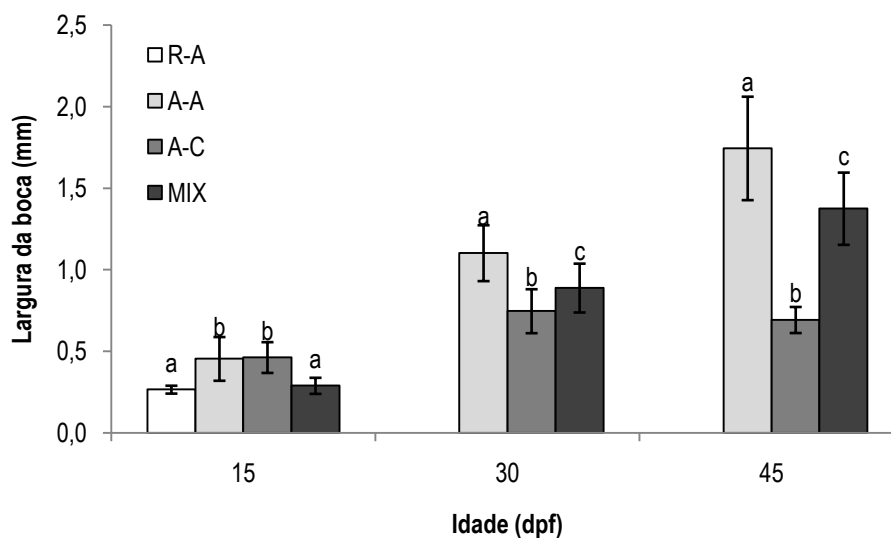


Figura 20: Largura média da boca dos peixes dos vários tratamentos aos 15, 30 e 45 dpf. A significância foi testada pelo método de Student-Newman-Keuls: $n=15$, $p<0.05$.

Aos 15 dpf, A-C foi a dieta que apresentou uma razão CP/CT significativamente maior que nos restantes tratamentos ($p<0.05$) (Figura 21), sugerindo um menor desenvolvimento da barbatana caudal. No que diz respeito a este parâmetro, não parecem existir diferenças significativas entre os restantes tratamentos aos 15, 30 e 45 dpf (devido a elevada variabilidade dos dados, não foi possível efectuar os testes de significância). Relativamente a LB/CT (Figura 22), aos 15 dpf, R-A e MIX foram as dietas que apresentaram a menor razão, demonstrando que, proporcionalmente ao CT a LB é menor nestas dietas. Nesta idade, A-C foi a dieta que apresentou a maior razão ($p<0.05$). Esta última diferença diminuiu gradualmente aos 30 dpf e aos 45 dpf.

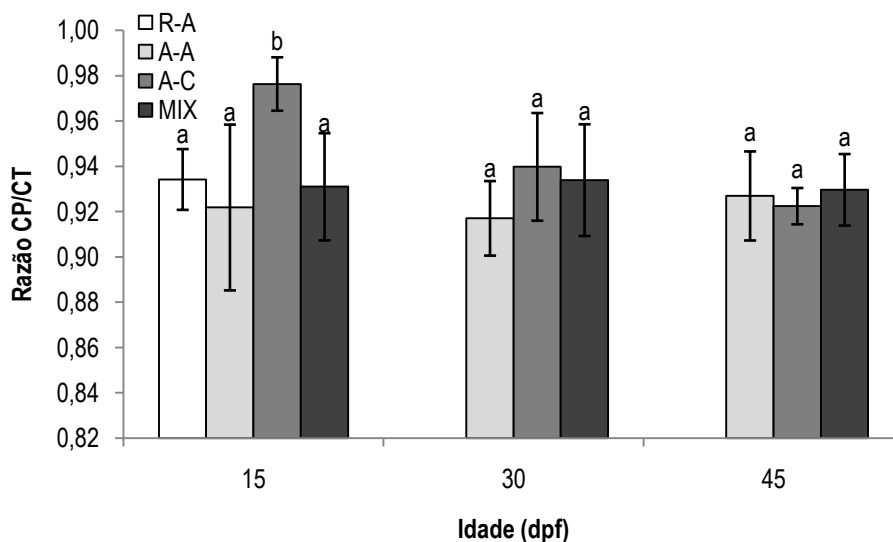


Figura 21: Razão média entre comprimento padrão e comprimento total dos peixes dos vários tratamentos aos 15, 30 e 45 dpf. A significância foi testada pelo método de Student-Newman-Keuls: n=15, p<0.05.

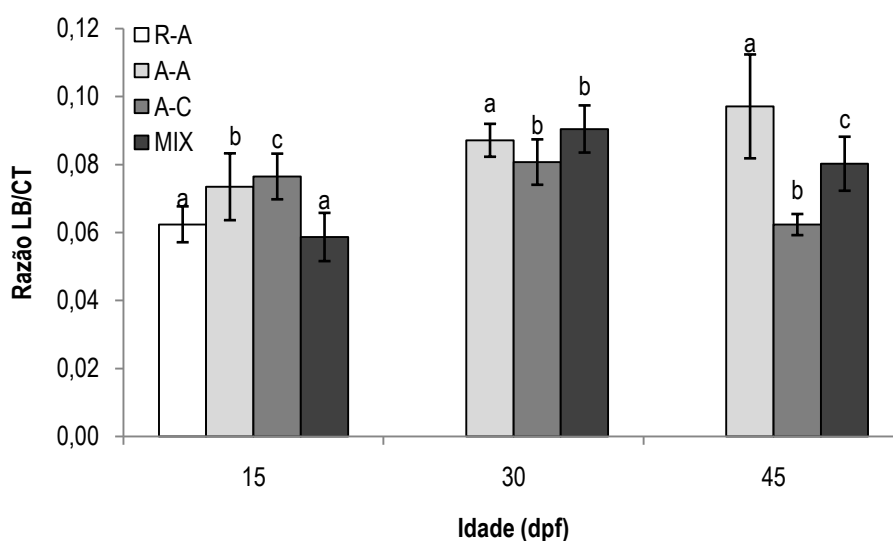


Figura 22: Razão média entre largura da boca e comprimento total dos peixes dos vários tratamentos aos 15, 30 e 45 dpf. A significância foi testada pelo método de Student-Newman-Keuls: n=15, p<0.05.

A partir dos dados de biometria obtidos foram calculadas as taxas específicas de crescimento (SGR) total e da boca (figura 23). Esta análise permitiu detectar diferenças (p<0.05), nomeadamente no que diz respeito às dietas R-A e A-C. Aos 15 dpf, R-A foi a dieta com a SGR total claramente inferior, comparativamente às restantes dietas. Esta diferença não mostrou ser tão acentuada ao nível da SGR da boca, tendo sido semelhante à obtida em MIX. Entre os 15 e os 30 dpf foi possível notar uma ligeira

diminuição das SGR total e da boca em A-C, comparativamente com o que ocorreu nas dietas A-A e MIX. Nesta idade (30 dpf), a dieta MIX apresentou também uma SGR total e da boca ligeiramente inferiores a A-A. A diminuição verificada em A-C aos 30 dpf, foi mais intensa aos 45 dpf, atingindo valores de SGR total e da boca consideravelmente inferiores às restantes duas dietas. Não parece ter ocorrido crescimento considerável da largura da boca em A-C a partir dos 15 dpf.

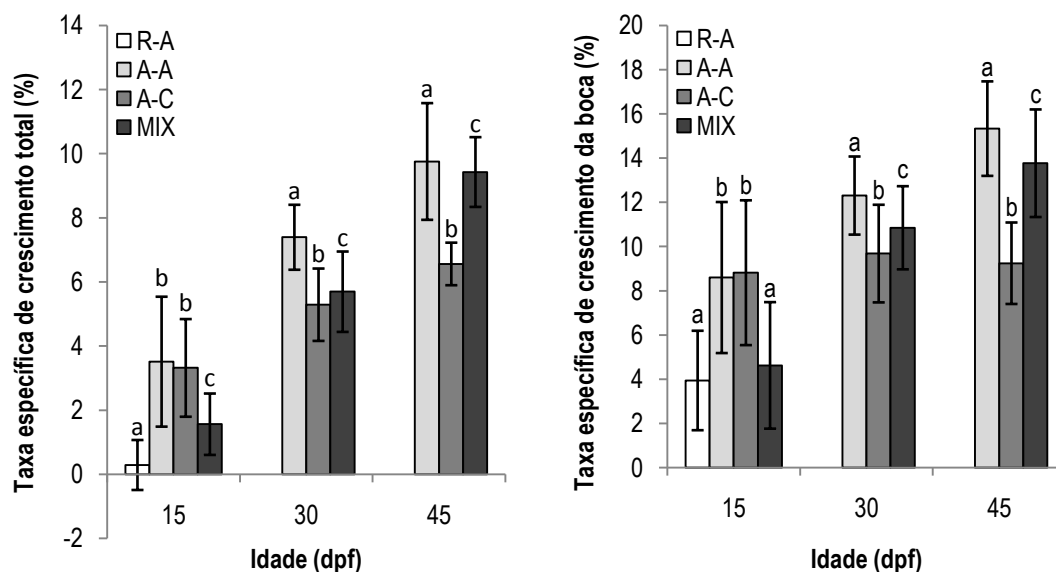


Figura 23: Taxas médias específicas de crescimento total e da boca, obtidas a partir do comprimento total e da largura da boca, respectivamente, de 15 peixes aos 4, 15, 30 e 45 dpf. A cada idade estão representadas as taxas de crescimento relativamente a indivíduos com 4 dpf. Para a determinação destes parâmetros foram considerados os dados biométricos de exemplares com 4 dpf como referência inicial. A significância foi testada pelo método de Student-Newman-Keuls: $n=15$, $p<0.05$.

4.2. Mineralização dos elementos esqueléticos

A análise de acumulação de cálcio, através da coloração do esqueleto com vermelho alizarin S, permitiu verificar diferenças ao nível do estado de desenvolvimento das estruturas esqueléticas entre tratamentos (figura 24, tabela V). R-A foi aquela que, comparando com as restantes dietas, apresentou atrasos na mineralização. Das estruturas consideradas (Gavaia *et al.*, 2006), os arcos branquiais e as vértebras e arcos neurais e hemais não se encontravam mineralizados em R-A, na maioria dos indivíduos analisados, ao contrário das restantes dietas. A análise do esqueleto permitiu ainda verificar diferenças na mineralização de outros elementos esqueléticos, como nos

pterigóforos. A-C apresentou um atraso na mineralização destes elementos, comparando com A-A e MIX, que apresentaram pterigóforos mineralizados aos 30 dpf.

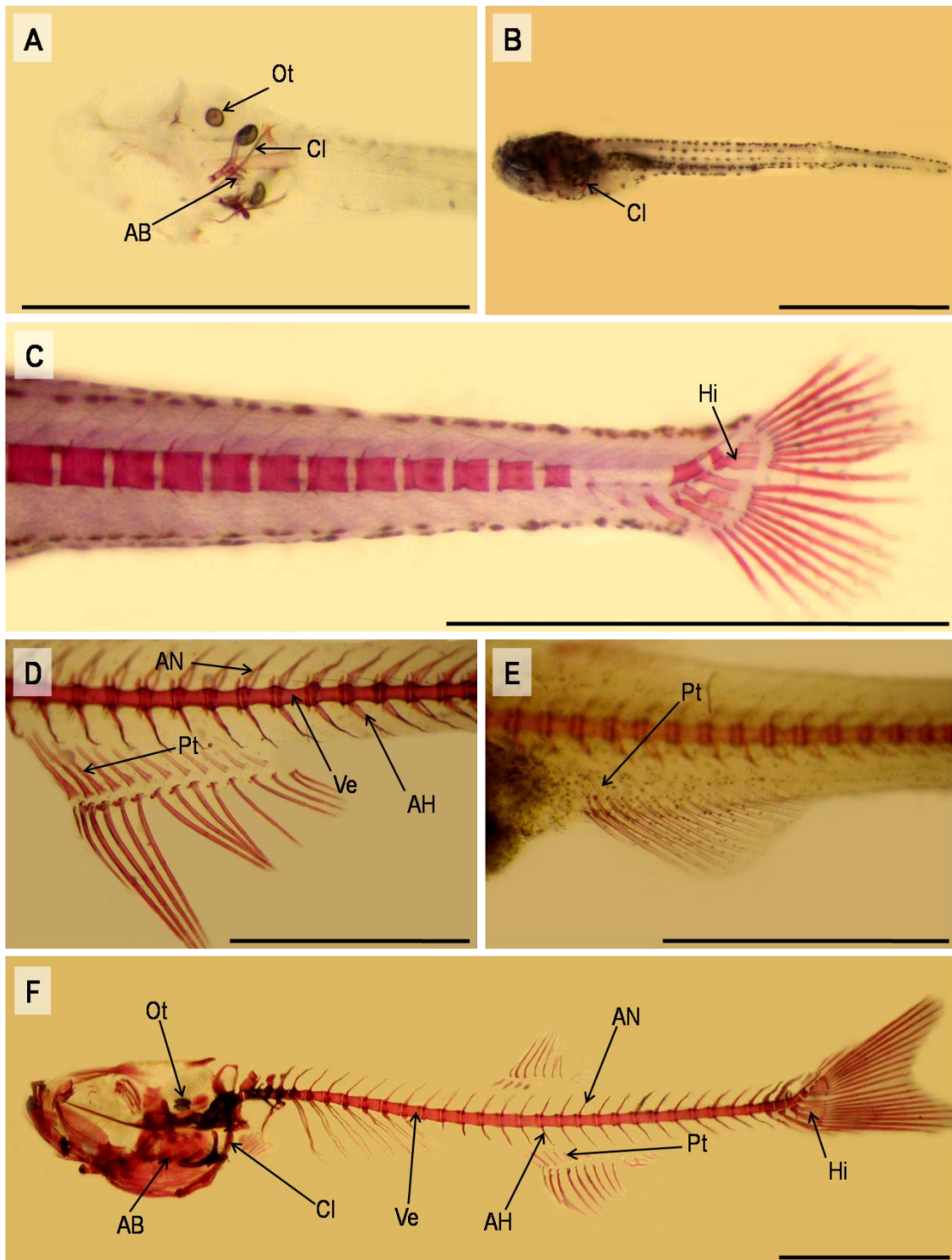


Figura 24: Representação fotográfica exemplificativa das várias estruturas ósseas e o seu estado de mineralização. A e B – atraso na mineralização em exemplares de R-A aos 15 dpf; C – hipurais mineralizados em exemplar de A-C aos 15 dpf; D – pterigóforos mineralizados e em mineralização em exemplar de MIX aos 30 dpf; E – pterigóforos não mineralizados em exemplar de A-C aos 30 dpf; F – visão global do esqueleto de exemplar de MIX aos 30 dpf. Ot: otólitos; AB: arcos branquiais; Cl: cleitrum; Ve: vértebras; AN: arcos neurais; AH: arcos hemais; Hi: hipurais; Pt: pterigóforos. A barra de escala representa 1.5 mm.

Tabela V: Sumarização da presença de estruturas mineralizadas. A azul estão representadas as estruturas mineralizadas (ou em mineralização) observadas, o cinzento representa a falta de informação relativa à dieta R-A aos 30 e 45 dpf e o verde representa sinais ténues de mineralização.

Estruturas	Dietas	Idade (dpf)		
		15	30	45
Otolitos	R-A			
	A-A			
	A-C			
	MIX			
Arcos branquiais	R-A			
	A-A			
	A-C			
	MIX			
Cleitrum	R-A			
	A-A			
	A-C			
	MIX			
Vértebras e arcos	R-A			
	A-A			
	A-C			
	MIX			
Hipurais	R-A			
	A-A			
	A-C			
	MIX			
Pterigóforos	R-A			
	A-A			
	A-C			
	MIX			

A análise do número médio de vértebras mineralizadas aos 15 dpf, que é um indicador do desenvolvimento global do esqueleto, permitiu identificar algumas diferenças entre tratamentos, em relação ao desenvolvimento da coluna vertebral (figura 25). R-A foi a dieta que apresentou uma menor percentagem de vértebras mineralizadas, tendo atingido um valor médio de cerca de 11%. As restantes dietas apresentaram, aos 15 dpf, uma mineralização vertebral mais ou menos semelhante, entre si. Porém, a dieta MIX apresentou uma grande variabilidade, pelo que a sua comparação com as restantes dietas não é conclusiva.

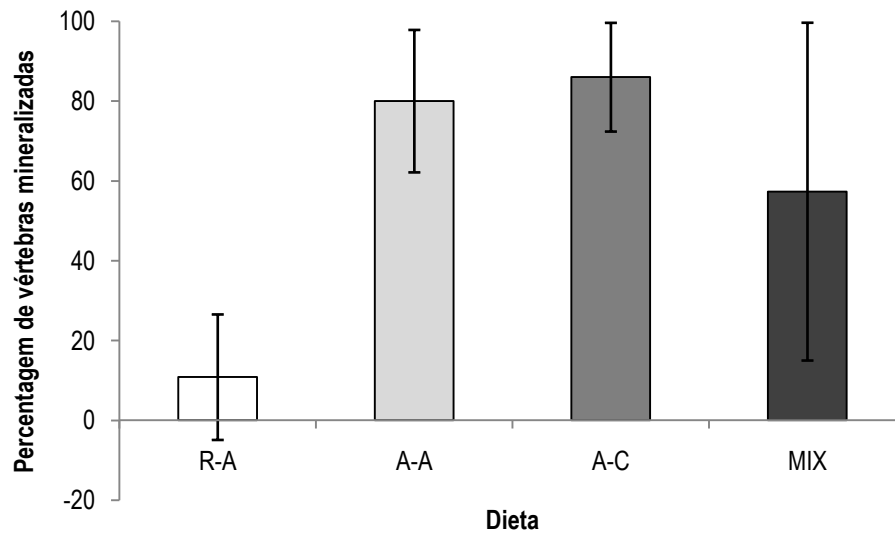


Figura 25: Mineralização vertebral aos 15 dpf, para todas as dietas testadas.

4.3. Análise de malformações esqueléticas

A coloração do esqueleto com vermelho alizarin S permitiu também a avaliação de deformações (tabela VI e figura 26). Existe uma tendência para o aumento da incidência de deformações com a idade. No que diz respeito à análise qualitativa de deformações, verificou-se que, aos 30 dpf, A-C foi a única dieta que não apresentou indivíduos malformados (tabela VI). Já A-A e MIX apresentaram, nesta idade, indivíduos deformados, nomeadamente ao nível da vacuolização dos elementos da hipuralia, principalmente os hipurais (figura 26B). Este tipo de malformação foi, particularmente frequente nestas dietas em indivíduos com 45 dpf, ocorrendo em 100% dos exemplares analisados. Aos 45 dpf, A-C não apresentou a mesma frequência de indivíduos com vacuolização dos elementos esqueléticos. Por outro lado, parece ter apresentado uma variedade ligeiramente superior de malformações a afectar os indivíduos, como fusão vertebral, deformação de parapófises, arcos vertebrais e hipurais e fusão de hipurais ou outros elementos da hipuralia. A dieta MIX apresentou também alguma variedade de malformações nos exemplares analisados, seguida da dieta A-A. A figura 26 mostra ainda alguns exemplos das deformações observadas.

Tabela VI: Percentagem das várias malformações observadas por cada idade em cada tratamento (n=5). Dados obtidos através da análise de peixes corados com vermelho alizarin S. A – vértebras; B – parapófises; C – arcos (neurais e hemais); D – costelas; E – hipurais, epurais e parhipurais; 1 – deformação; 2 – fusão; 3 – vacuolização; 4 – supranumerário.

Malformações	Idade (dpf)									
	15				30			45		
	R-A	A-A	A-C	MIX	A-A	A-C	MIX	A-A	A-C	MIX
A2	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0
B1	0	0	20	0	0	0	0	40	20	0
B2	0	0	0	0	0	0	20	0	0	20
B4	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
C1	0	0	0	0	0	0	0	40	20	0
C2	0	0	0	0	0	0	20	0	0	20
C4	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
E1	0	0	20	0	0	0	0	0	20	0
E2	0	0	0	0	20	0	0	0	20	0
E3	0	0	0	0	60	0	40	100	20	100

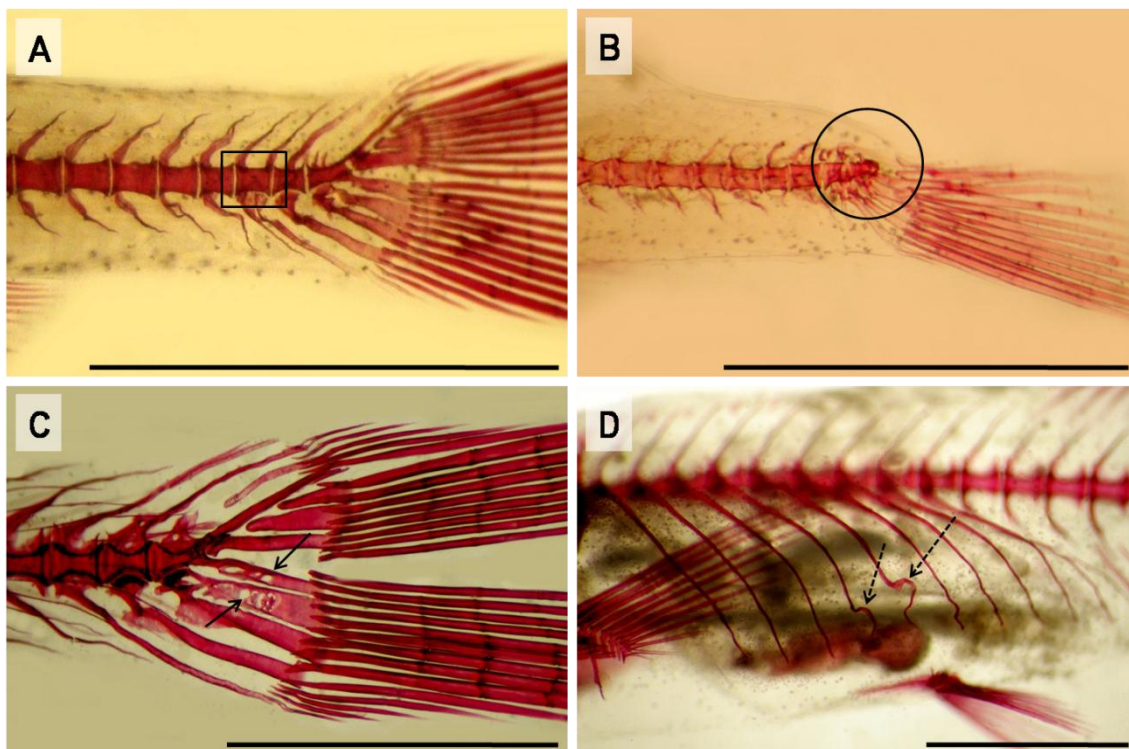


Figura 26: Exemplificação de algumas das anomalias esqueléticas mais frequentemente observadas. A – fusão vertebral (rectângulo) em exemplar de A-C aos 45 dpf – a uma única vértebra estão associados dois pares de arcos neurais e dois pares de arcos hemais; B – deformação grave que afecta grande parte das estruturas de todo o complexo da hipuralia (círculo), sem formação de uróstilo, em exemplar de A-C aos 45 dpf; C – vacuolização de dois hipurais (setas a sólido) em exemplar de MIX aos 45 dpf; D – duas costelas deformadas (setas a tracejado) em exemplar de A-C aos 45 dpf. A barra de escala representa 1.5 mm.

A análise quantitativa de deformações – efectuada pela determinação do número de estruturas afectadas por peixe – que permite, de um modo geral, inferir acerca da gravidade das deformações – mostrou, igualmente, uma tendência para um aumento de elementos esqueléticos malformados com a idade (figura 27). Devido a elevada variabilidade entre espécimes das mesmas dietas, não foi possível verificar diferenças entre tratamentos em nenhuma das idades amostradas.

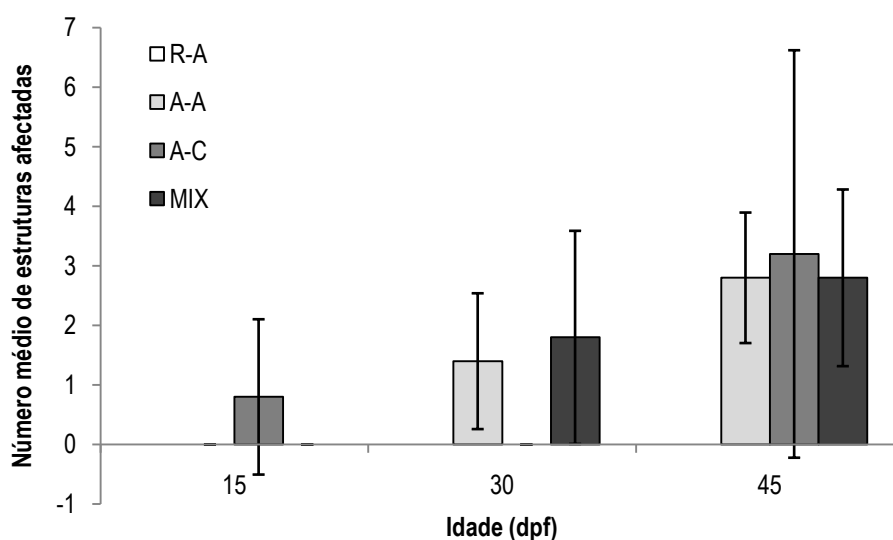


Figura 27: Número médio de estruturas com malformação por peixe (n=5).

4.4. Expressão genética de *oc* e *mgp*

A análise ao nível molecular permitiu, com o uso de ferramentas de expressão genética, a determinação de tendências ao longo do desenvolvimento do peixe-zebra e de diferenças entre tratamentos. Os resultados de expressão genética relativa, obtidos através de PCR em Tempo Real, sugerem tendências específicas consistentes ao longo do desenvolvimento ontogénico do peixe-zebra e diferenças aparentes no que diz respeito a espécimes alimentados com regimes dietéticos distintos. A figura 28 mostra os níveis relativos de expressão genética de *oc* e *mgp*, respectivamente, em relação à expressão genética em larvas com 4 dpf não alimentadas. No que diz respeito à dieta A-C, a *oc* parece ter sido expressa em níveis crescentes dos 15 aos 45 dpf. Peixes alimentados segundo a dieta R-A, parecem ter apresentado uma sub-expressão de *oc* relativamente aos restantes tratamentos e, inclusivamente, em relação ao controlo (larva com 4 dpf não alimentada). Para além da dieta R-A, aos 15 dpf as amostras da A-C apresentaram também níveis consideravelmente inferiores de expressão de *oc*, relativamente aos restantes tratamentos, tendo apresentado, aos 45, os níveis mais

elevados de expressão. A-A e MIX seguiram uma tendência de expressão relativa de *oc* semelhante durante o desenvolvimento inicial.

A expressão de *mgp* não parece ter seguido uma tendência específica ao longo do desenvolvimento, com excepção da dieta MIX que, aos 15 dpf apresentou os níveis mais elevados tanto entre amostragens como entre tratamentos. R-A foi, aos 15 dpf, a dieta que, tal como ocorreu em relação à expressão de *oc*, apresentou os níveis mais reduzidos de expressão de *mgp*. No que diz respeito às restantes dietas não ocorreram diferenças acentuadas em nenhuma das idades amostradas.

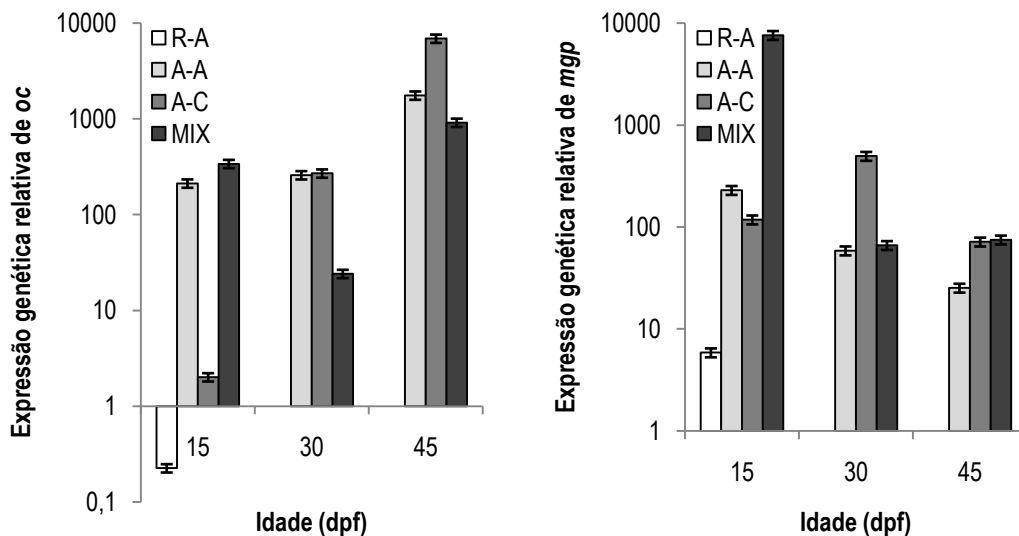


Figura 28: Expressão relativa de *oc* e *mgp* de peixes inteiros em função da idade, para todos os tratamentos amostrados. Os valores representam a expressão genética relativamente à expressão de larvas com 4 dpf.

4.5. Acumulação de Oc e Mgp

As análises de imunohistoquímica permitiram localizar regiões de acumulação das duas proteínas relacionadas com o esqueleto consideradas. Os dados obtidos não permitiram a detecção de diferenças evidentes entre tratamentos ou entre idades, excepto relativamente à dieta R-A. Nesta última não foi possível detectar a presença de Oc ou Mgp na maioria das estruturas. Comparativamente às restantes dietas consideradas, R-A não mostrou a presença de nenhuma destas proteínas, por exemplo, ao nível das brânquias e arcos branquiais, como é possível verificar na figura 29. Contudo, na mesma figura mostra-se que R-A apresentou uma ligeira acumulação de Oc e Mgp na calvária. As restantes dietas apresentaram uma acumulação relativamente homogénea entre si e consistente entre as várias secções observadas.

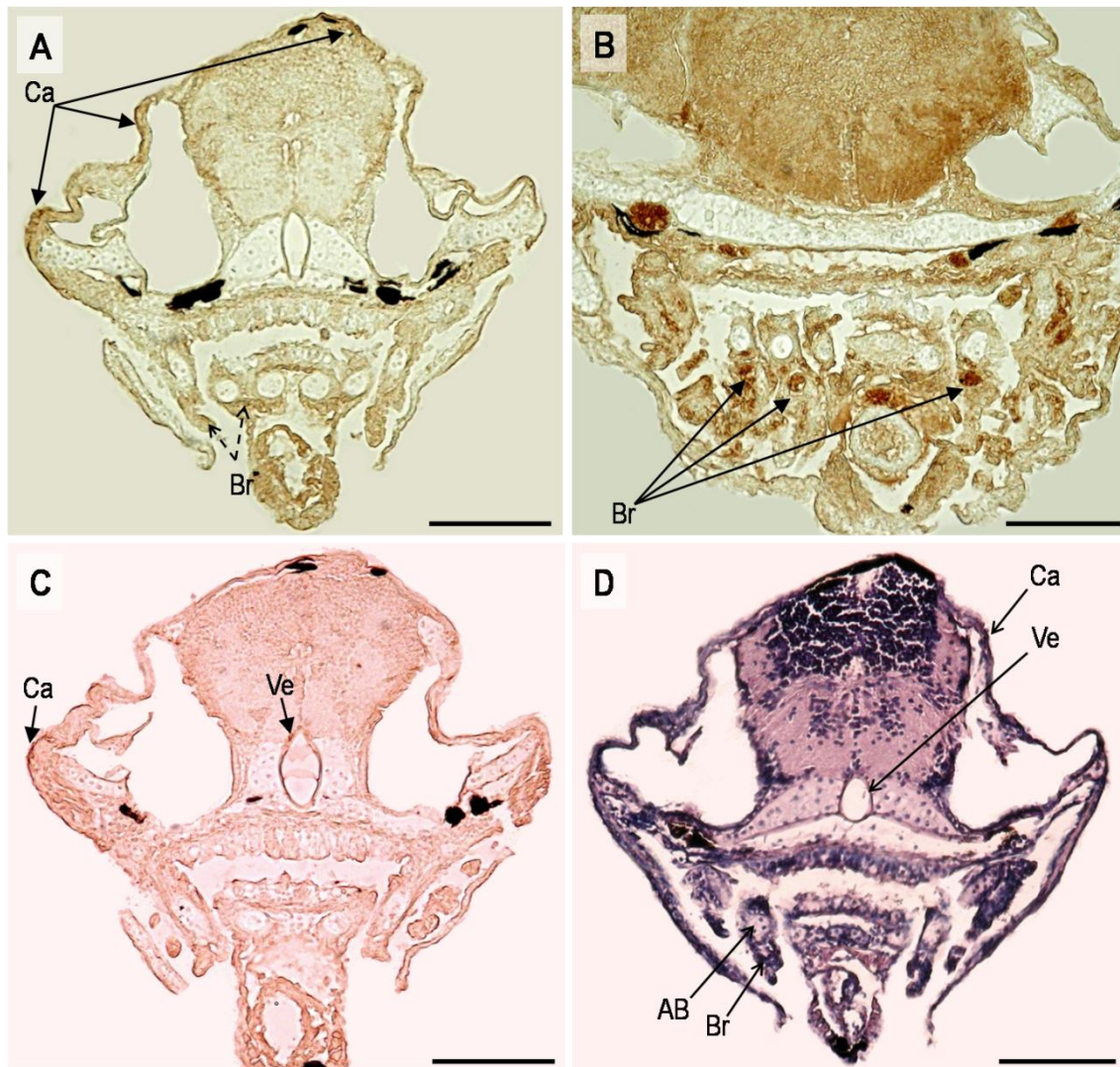


Figura 29: Imunolocalização de acumulação de Oc e Mgp e correspondente caracterização histológica com hematoxilina. A – acumulação de Oc na calvária de exemplares de R-A aos 15 dpf e não acumulação nas brânquias e arcos branquiais; B – acumulação de Oc nas brânquias e arcos branquiais de exemplares de MIX aos 15 dpf; C – acumulação de Mgp na calvária (sinal fraco) e vértebra de exemplar de R-A aos 15 dpf; D – caracterização histológica com hematoxilina da região craniana de exemplar de R-A aos 15 dpf. Ca: calvária; Br: branquiais; AB: arcos branquiais; Ve: vértebras. A barra de escala representa 70 μm .

Uma exploração mais generalista dos resultados de imunohistoquímica permitiu determinar locais específicos de acumulação de Oc e Mgp comuns, de um modo geral, a todos os tratamentos aos 30 e 45 dpf. Foi, por exemplo, observada a acumulação de Oc nas vértebras (figura 30A e 30B) e em tecido ósseo endocondral em formação nos pterigóforos (figura 30C e 30F). A Mgp, característica de estruturas tanto cartilagueas como ósseas foi encontrada na vértebra, notocorda (figura 30D e 30E) e na calvária (figura 30I). Foi ainda determinada a sua presença associada a estruturas cartilagueas cranianas (figura 30I) e em tecido renal (figura 30G e 30H).

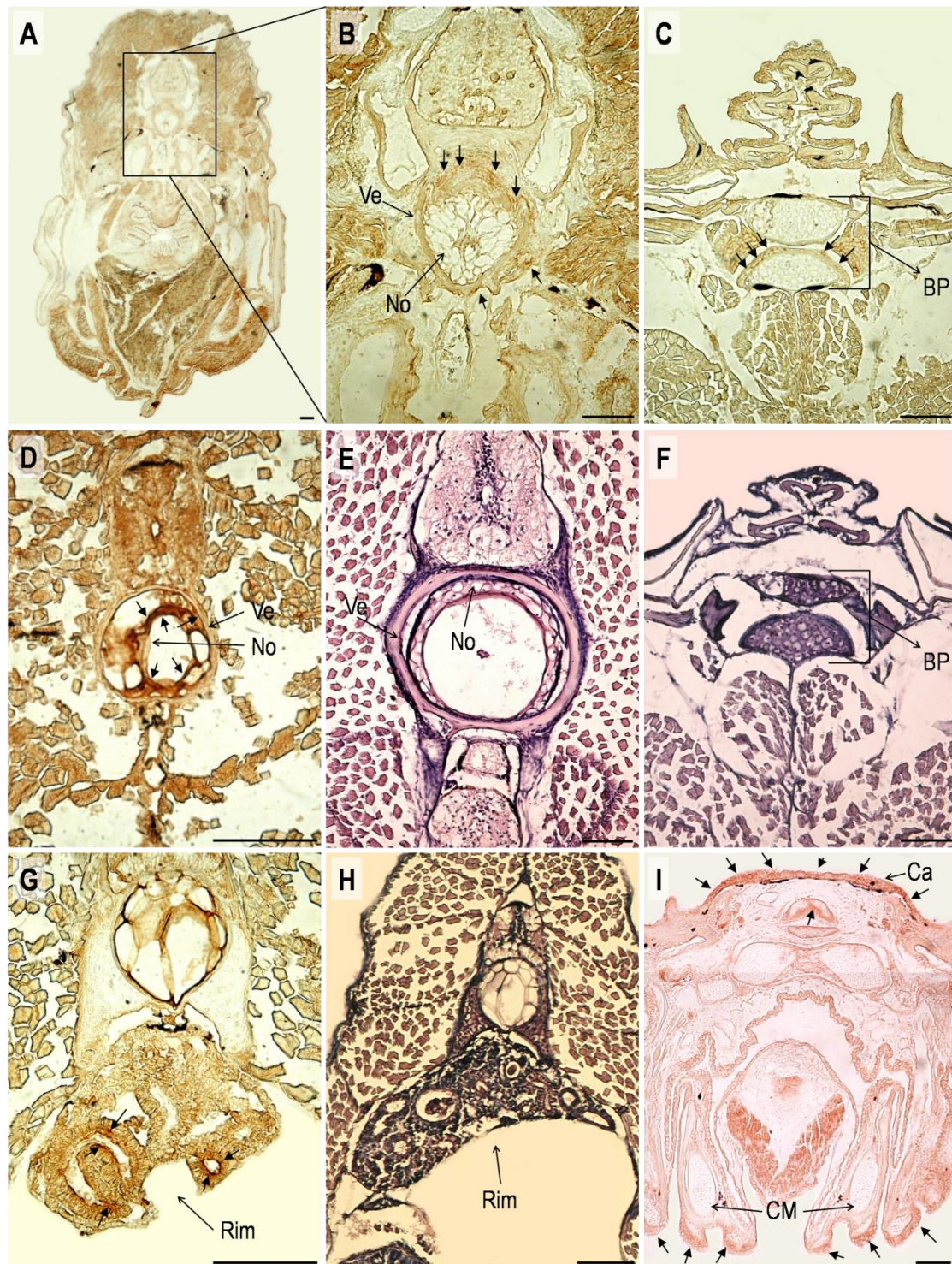


Figura 30: Imunolocalização de acumulação de Oc e Mgp e correspondente caracterização histológica com hematoxilina. A e B – acumulação de Oc nas vértebras de exemplares de A-A aos 30 dpf; C – acumulação de Oc em exemplares de A-A aos 45 dpf; D – acumulação de Mgp na região vertebral e notocorda de exemplares de A-C aos 45 dpf; E – caracterização histológica da região vertebral em exemplar de A-A aos 45 dpf; F – caracterização histológica da região da barbatana dorsal em exemplar de A-A aos 45 dpf; G – acumulação de Mgp no rim de exemplar de A-C aos 45 dpf; H – caracterização histológica da vértebra e do rim de exemplar de A-C aos 45 dpf; I – acumulação de Mgp na calvária e na periferia de cartilagens bucais de exemplar de MIX aos 45 dpf. Ve: vértebra; No: notocorda; BP: cartilagens da articulação da barbatana dorsal com os pterigóforos; Ca: calvária; CM: cartilagem de Meckel. A barra de escala representa 70 μ m.

4.6. Identificação de locais de reabsorção óssea

Considerando os dados da demonstração da actividade da fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP), não se verificaram diferenças entre dietas e/ou idades no que diz respeito à reabsorção de tecido ósseo (actividade osteoclástica). Todavia, foi possível identificar e localizar regiões específicas de remodelação/reabsorção óssea. Aos 15 dpf, nenhuma das dietas apresentou estruturas com remodelação óssea activa, uma vez que em nenhuma das secções analisadas foi detectada actividade da TRAP. Aos 30 dpf foi já possível identificar estruturas com actividade osteoclástica evidente. Verificou-se actividade osteoclástica intensa associada a arcos neurais (figura 31A) e a outras estruturas ósseas (e em ossificação) tanto intramembranasas no crânio (figura 31B) como endocondrais (figura 31C). Aos 45 dpf, verificou-se, de igual modo, actividade osteoclástica intensa associada a arcos neurais (figuras 31D e 31E) e a estruturas ósseas cranianas como cápsulas óticas e estruturas associadas (figuras 31D e 31E) e arcos branquiais (figura 31F).

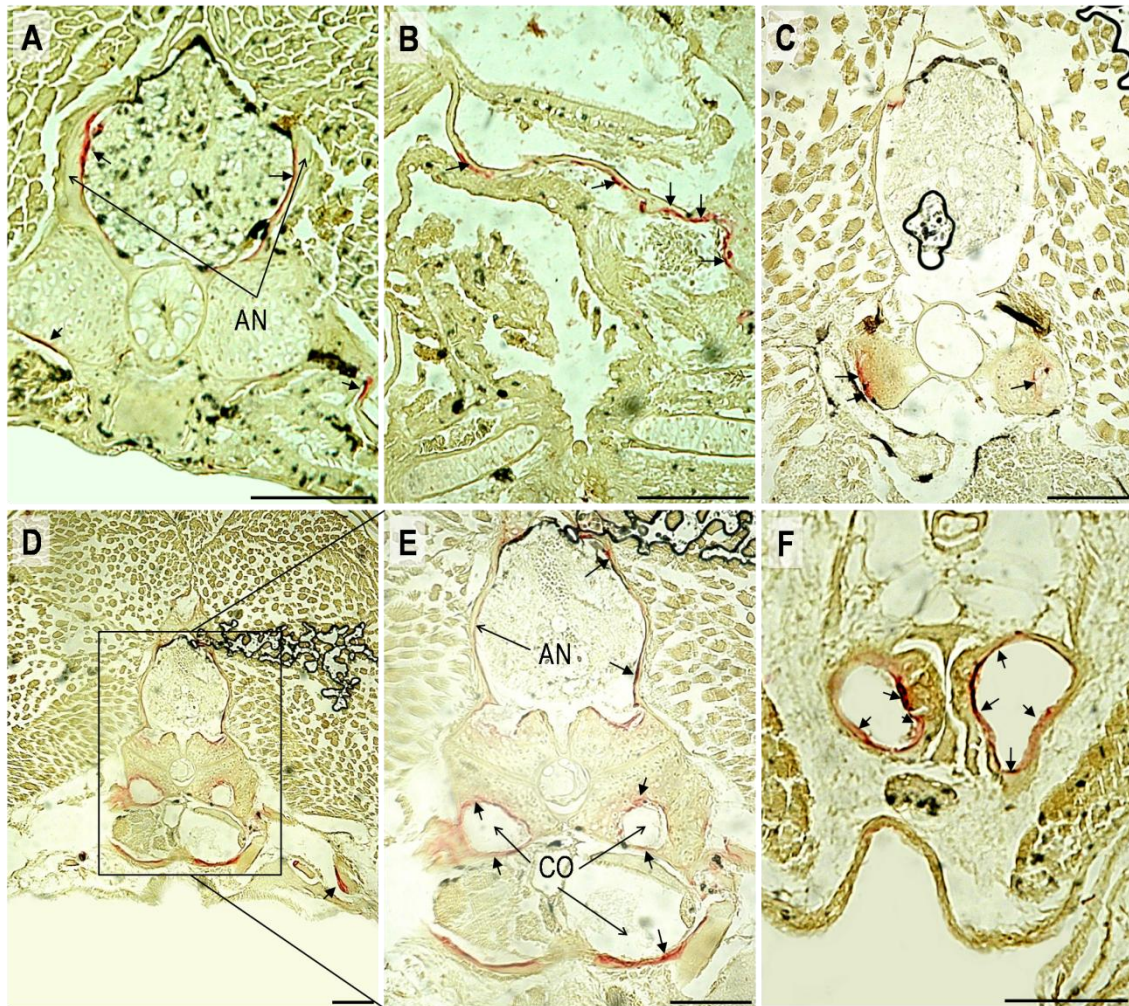


Figura 31: Actividade da fosfatase ácida resistente ao tartrato. A – actividade da TRAP nos arcos neurais em exemplar de A-A aos 30 dpf; B – actividade da TRAP em tecido ósseo do crânio formado intramembranosamente em exemplar de A-A aos 30 dpf; C – actividade da TRAP em tecido ósseo associado às vértebras formado endocondralmente em exemplar de A-A aos 45 dpf; D e E – actividade da TRAP nas cápsulas óticas e arcos neurais em exemplar de MIX aos 45 dpf; F – actividade da TRAP nos arcos branquiais em exemplar de MIX aos 45 dpf. CO: cápsulas óticas; AN: arcos neurais. A barra de escala representa 70 μm .

4.7. Expressão genética de *amilase* e *tripsina*

Os dados relativos à expressão de *amilase* revelaram diferenças evidentes entre os tratamentos (figura 32) e parecem demonstrar uma tendência específica ao longo do desenvolvimento: níveis basais no início do desenvolvimento antes de um máximo de expressão, por sua vez, seguido de um decréscimo. Esta tendência foi verificada em todos os tratamentos, excepto na dieta MIX. Os maiores níveis de expressão do gene ocorreram na dieta MIX aos 15 dpf. Estes níveis são bastante menores nas fases seguintes (aos 30 e 45 dpf). Os restantes tratamentos apresentaram, aos 15 dpf, níveis de expressão de *amilase* mais reduzidos, próximos dos níveis de expressão do controlo.

Aos 30 dpf ocorreu um aumento dos níveis de expressão nos espécimes alimentados de acordo com as dietas A-A e A-C, que diminuiu ligeiramente aos 45 dpf.

Relativamente à *tripsina* os dados não mostraram, na maioria das dietas consideradas, uma tendência de expressão específica evidente ao longo do desenvolvimento (figura 32). A exceção ocorreu na dieta A-A que revelou níveis de expressão da enzima gradualmente menores, sendo a dieta com os níveis inferiores de expressão de *tripsina* aos 45 dpf. Aos 15 dpf, R-A e A-C apresentaram uma sub-expressão da enzima, tendo os maiores níveis de expressão de *tripsina* ocorrido na dieta A-C aos 30 dpf. Aos 45 dpf, A-A apresentou uma acentuada sub-expressão de *tripsina*.

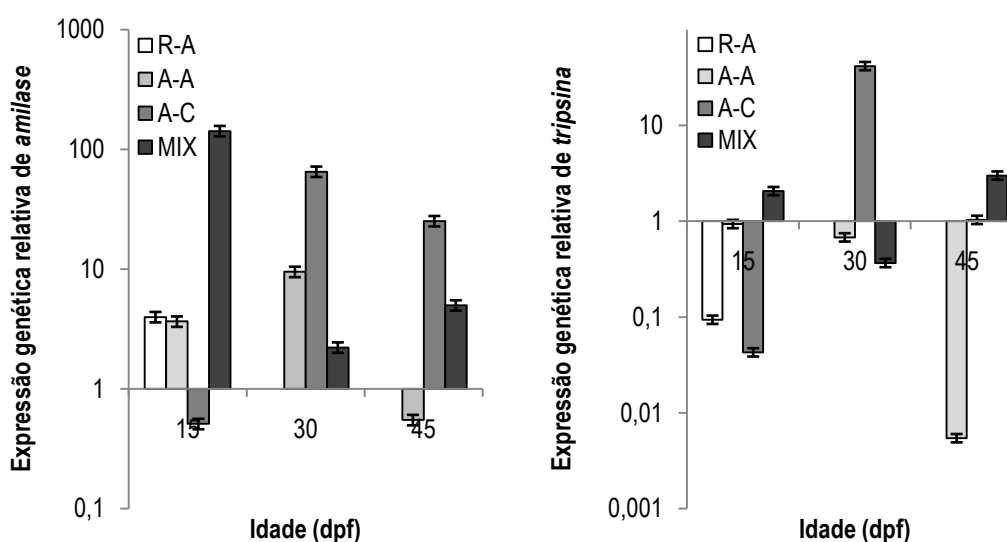


Figura 32: Expressão relativa de *amilase* e *tripsina* de exemplares completos em função da idade, para todos os tratamentos amostrados. Os valores representam a expressão genética relativamente à expressão de larvas com 4 dpf.

4.8. Desenvolvimento do tracto digestivo

A análise histológica dos espécimes analisados, por colaração com hematoxilina, não permitiu detectar diferenças morfológicas notórias, entre os tratamentos. Porém, de um modo geral, R-A e MIX pareciam estar subdesenvolvidos aos 15 dpf em relação a A-A e A-C (figura 33). Este subdesenvolvimento foi visível, principalmente, ao nível do esófago, apresentando um número de vilosidades menor nas primeiras.

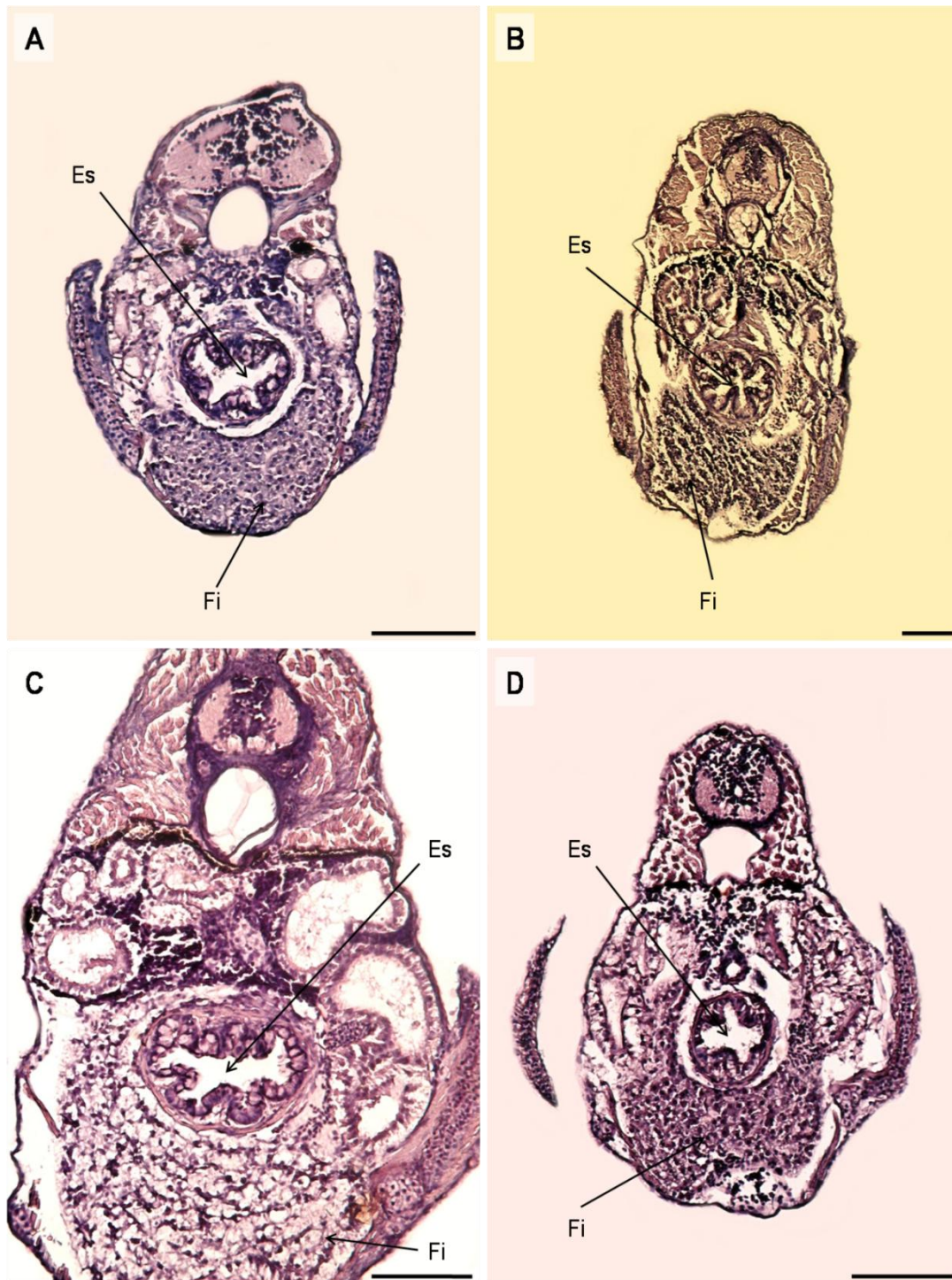


Figura 33: Caracterização histológica da região inicial do tracto digestivo de exemplares de A) R-A, B) A-A, C) A-C e D) MIX, aos 15 dpf. Es: esôfago; Fi: fígado. A barra de escala representa 70 μ m.

A análise histológica permitiu ainda caracterizar o tracto digestivo do peixe-zebra (figura 34) nas melhores condições alimentares testadas. Para esta análise foi considerada a dieta A-A como modelo, uma vez que é uma das dietas que apresentou, de uma forma geral, dos melhores parâmetros de crescimento, sobrevivência e

desenvolvimento. Foi possível localizar os vários órgãos associados ao sistema digestivo, tal como a região bucal e estruturas esqueléticas associadas, bem como estruturas esqueléticas não associadas directamente. A presença de cartilagens com condrócitos hipertróficos evidentes permitiu a identificação das estruturas esqueléticas endocondrais (trabécula e cartilagens trabeculares, palatoquadrato, ceratohial, hiosimplético). No início do tracto digestivo foram observados os dentes faríngicos, associados ao 5º par de arcos branquiais e envolvidos no processo de deglutição e digestão, e o fígado ocupando grande parte da região abdominal e envolvendo estruturas do tubo digestivo como o esófago e, posteriormente o intestino. Associada à parte externa da parede do intestino foi observada uma estrutura identificada como pâncreas (componente exócrina e o que parece ser o ilhéu de Langerhans).

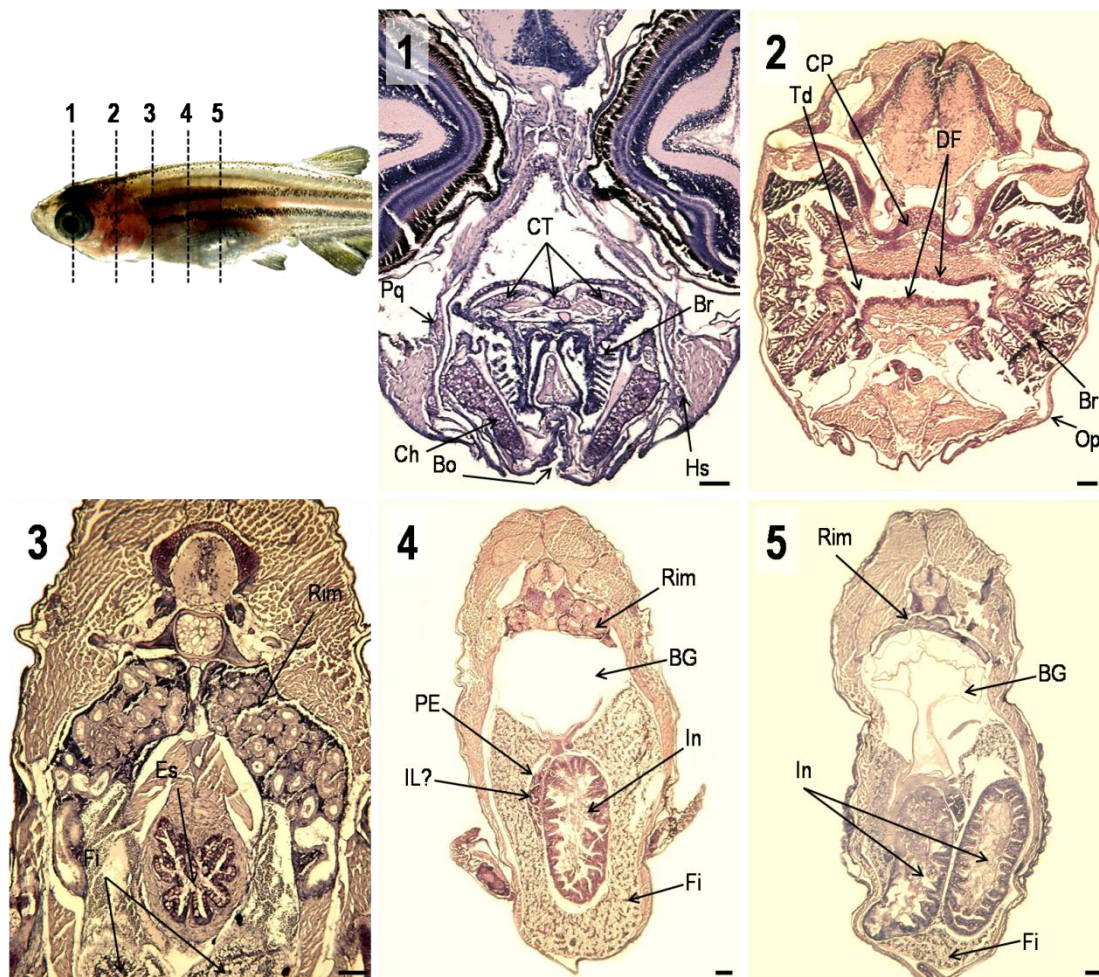


Figura 34: Caracterização histológica da região craniana e do tracto digestivo de exemplar de A-A aos 30 dpf. As secções encontram-se numeradas segundo orientação rostro-caudal. CT: cartilagens trabeculares; Pq: palatoquadrato; Br: brânquias; Ch: ceratohial; Bo: boca; Hs: hiosimplético; CP: cartilagem paracordal; DF: dentes faríngicos; Td: início do tracto digestivo; Op: opérculo; Es: esófago; Fi: fígado; BG: bexiga gasosa; PE: pâncreas exócrino; IL: ilhéu de Langerhans; In: intestino. A barra de escala representa 70 µm.

V. DISCUSSÃO

Este trabalho focou-se no estudo do efeito da dieta nas fases de desenvolvimento inicial do peixe-zebra, um teleósteo de água doce com um grande e crescente potencial na investigação molecular. O efeito do alimento no desenvolvimento e na performance de larvas e juvenis de peixe-zebra é um assunto pouco estudado, principalmente em relação ao efeito que a dieta exerce na ontogenia desta espécie ao nível molecular, particularmente na osteogénese e na condrogénese. Foram comparadas quatro dietas distintas, tendo sido determinados os parâmetros de sobrevivência e crescimento em três idades (15, 30 e 45 dpf). Foi avaliada a mineralização e ocorrência de malformações dos elementos esqueléticos e utilizaram-se ferramentas moleculares, de modo a determinar a expressão genética de marcadores do desenvolvimento esquelético e digestivo e a acumulação de proteínas associadas ao processo de mineralização (Oc) e de remoção óssea (Mgp). Os resultados obtidos são discutidos nesta secção segundo uma perspectiva comparativa, de acordo com bibliografia existente.

5.1. Mortalidade e crescimento

Por convenção, no cultivo de peixe-zebra, é usado alimento vivo nas fases iniciais de desenvolvimento, como nauplius de *Artemia*, rotíferos e, ainda, paramécias (Lawrence, 2007; Westerfield, 2007). Alguns estudos demonstraram já que o potencial dos alimentos processados e/ou inertes actualmente existentes é restrito quando aplicados ao cultivo de larvas desta espécie (Carvalho *et al.*, 2006; Goolish *et al.*, 1999), tal como noutros teleósteos (*e.g.*, Blair *et al.*, 2003). Relativamente aos parâmetros de sobrevivência e crescimento, os dados obtidos neste trabalho sugerem que os rotíferos utilizados (de água salgada) não constituem um alimento adequado ao desenvolvimento do peixe-zebra, tendo sido obtidos valores mínimos de sobrevivência e dos vários comprimentos analisados, bem como as menores taxas específicas de crescimento total e da boca dos 4 aos 15 dpf. Foi excluída a hipótese de a quantidade de rotíferos por refeição ser subestimada, uma vez que foi aplicada uma dose superior à utilizada, regularmente, (Lawrence, 2007) e foram observadas grandes quantidades de rotíferos no fundo dos aquários no final dos dias. A qualidade da água manteve-se dentro dos parâmetros considerados normais, pelo que uma elevada mortalidade devido a este factor não foi considerada. As espécies de rotíferos utilizadas (*B. plicatilis* e *B. rotundiformis*) são espécies marinhas e com uma reduzida tolerância a ambientes

hipotônicos. Após a sua introdução nas caixas (com água doce) a sua capacidade natatória é reduzida, pouco tempo depois morrem e acabam por acumular-se no fundo. As larvas de peixe-zebra, apesar de possuírem um comportamento naturalmente predador, nas fases iniciais não estão suficientemente desenvolvidas para terem um comportamento de busca de alimento totalmente desenvolvido. Assim, a sua capacidade de alimentação reduz drasticamente, o que poderá justificar a elevada mortalidade verificada na dieta R-A. Como alternativa às espécies marinhas de rotíferos, poderão ser utilizados rotíferos de água doce, como por exemplo *B. calyciflorus*, utilizado no cultivo de algumas espécies de água doce (Dhert, 1996), nomeadamente na larvicultura de peixes ornamentais (Lim & Wong, 1997). Este fenómeno pode, então, justificar tanto a elevada mortalidade observada em R-A, como os comprimentos mais reduzidos obtidos aos 15 dpf. Outra justificação poderá estar associada à componente nutricional dos rotíferos enquanto alimento para os peixes. Hamre (2008) demonstraram que, de um modo geral, os rotíferos carecem de determinados micronutrientes importantes no metabolismo dos teleósteos. Contudo, a primeira sugestão parece ser mais provável, pois ao nível da composição nutritiva em proteínas, lípidos, hidratos de carbono e ácidos gordos essenciais, não existem diferenças consideráveis entre os rotíferos e os nauplius de *Artemia*, em cujos tratamentos se obtiveram menores mortalidades.

Apesar de terem sido obtidas mortalidades semelhantes entre A-C e A-A, os dados obtidos sugerem que Cyclop-eezeTM não constitui, por si só, um alimento apropriado para larvas desta espécie. Aos 15 dpf, todos os comprimentos determinados (CT, CP e LB) foram semelhantes entre A-A e A-C, uma vez que a esta idade os peixes de ambas as dietas terão sido alimentados igualmente com nauplius de *Artemia*. A partir dos 30 dpf, foi possível verificar uma diminuição destes parâmetros em A-C comparativamente a A-A e MIX, coincidentemente com a amostragem posterior ao desmame de nauplius de *Artemia* para alimento inerte. Esta diferença foi mais acentuada aos 45 dpf e, particularmente em LB e LB/CT, o que sugere uma redução considerável da largura da boca em comparação aos restantes tratamentos. Os dados obtidos através da análise das taxas de crescimento (SGR) total e da boca são bastante evidentes relativamente a esta dieta. A partir dos 30 dpf A-C apresentou as menores SGR, tendo esta diferença sido mais acentuada aos 45 dpf. Relativamente à SGR da boca parece não ter ocorrido crescimento dos 30 aos 45 dpf, eventualmente na sequência da oferta de um alimento pouco adequado às necessidades larvares e juvenis da espécie. Estes dados mostram então que, tal como verificado noutros estudos relativamente a dietas processadas e/ou

inertes (Goolish *et al.*, 1999; Carvalho *et al.*, 2006), o Cyclop-eezeTM não constitui uma dieta inerte adequada aos requisitos das larvas de peixe-zebra. O desmame das larvas poderá ser efectuado após os 15 dpf e deverá ser determinada a idade óptima de desmame do peixe-zebra com este tipo de alimento. Ao contrário do que se tem verificado no peixe-zebra, alguns trabalhos têm demonstrado resultados positivos com o uso de alimentos inertes, como no caso de *Lates calcarifer* (Bloch), no qual Curnow *et al.* (2006a) mostraram o uso desnecessário de *Artemia* aquando do desmame para dietas comerciais. Porém, a exclusão completa de alimento vivo não revelou resultados positivos na mesma espécie (Curnow *et al.*, 2006b).

Nauplius de *Artemia* parecem constituir, de entre as dietas testadas, um alimento apropriado ao desenvolvimento do peixe-zebra, como já verificado por outros autores (Goolish *et al.*, 1999; Carvalho *et al.*, 2006). Carvalho *et al.* (2006) compararam várias dietas, de entre as quais dietas inertes (comerciais, práticas e purificadas). O seu trabalho demonstrou que nauplius de *Artemia* constituem, de entre as dietas testadas, o alimento inicial mais adequado ao desenvolvimento do peixe-zebra, uma vez que promove um maior crescimento e sobrevivência. A dieta MIX, apesar de ter comprimentos, na globalidade, semelhantes aos obtidos em A-A, foi a dieta que obteve a menor mortalidade registada em todos os tratamentos. Este facto sugere que uma mistura de vários alimentos (vivo e inerte) é favorável ao cultivo do peixe-zebra, sendo uma dieta nutritivamente mais rica, o que está de acordo com resultados obtidos para outras espécies. Apesar dos resultados negativos obtidos com o uso de alimento inerte nas fases iniciais de desenvolvimento, foram já registadas as vantagens, em termos de crescimento e sobrevivência, do uso de dietas mistas em alimento vivo e inerte noutras espécies (*e.g.*, Cañavate & Fernández-Díaz, 1999) e também no peixe-zebra (Önal & Langdon, 2000). Estes autores mostraram que o uso complementar de rações microparticuladas com nauplius de *Artemia* não reduz, até certa medida, o crescimento ou a sobrevivência.

Os parâmetros de sobrevivência obtidos (bem como os de comprimentos) em peixes alimentados com nauplius de *Artemia* (A-A) no presente trabalho não vão de encontro aos obtidos por Carvalho *et al.* (2006): 39% e 86% de sobreviventes aos 21 dpf, respectivamente. Isto poderá estar relacionado com outros parâmetros de cultivo, tais como o sistema de cultivo e a densidade. Carvalho *et al.* (2006) terão utilizado um sistema de recirculação de água desde o início do tratamento e uma densidade inicial de 18 peixes / l. Neste trabalho, considerou-se importante, porém, aplicar uma densidade

de cultivo superior (~222 peixes / l), que vai mais de encontro às densidades aplicadas na generalidade dos biotérios. Estes dados sugerem que, para além da dieta e da componente nutricional do cultivo do peixe-zebra, a densidade poderá ser um factor limitante da sobrevivência do peixe-zebra.

Os dados de sobrevivência obtidos sugerem ainda que ocorre um período crítico, no peixe-zebra, entre os 10 e os 14 dpf, pelo que um estudo pormenorizado sobre este fenómeno será importante, de modo a conhecer as vulnerabilidades da espécie em cativeiro.

5.2. Processos de mineralização e patologia esquelética

O processo de mineralização está intimamente relacionado com o desenvolvimento global dos peixes e, deste modo, indirectamente relacionado com o alimento e com os aspectos nutricionais (Roy *et al.*, 2002; Cahu *et al.*, 2003; Lall & Lewis McCrea, 2007). Nesta secção irão ser discutidos os processos de mineralização e de ocorrência de malformações esqueléticas em função da dieta.

5.2.1. Desenvolvimento esquelético do peixe-zebra

Ao nível tecidular, considerando os dados de acumulação de cálcio, que se traduzem no estado de mineralização dos elementos esqueléticos, verificou-se que, de entre todas as dietas testadas, R-A foi a que apresentou uma menor mineralização do esqueleto, nomeadamente ao nível dos arcos branquiais, dos hipurais e das vértebras e arcos, encontrando-se as vértebras particularmente sub-mineralizadas em comparação com as restantes dietas, aos 15 dpf. Estas estruturas, nomeadamente os hipurais – que reflectem o desenvolvimento da barbatana caudal – e as vértebras – que reflectem o desenvolvimento do tronco – podem ser consideradas indicadores do desenvolvimento geral do esqueleto, revelando, assim, um atraso considerável do desenvolvimento esquelético em R-A. Este atraso na mineralização é devido ao atraso no crescimento dos peixes alimentados de acordo com esta dieta. Foi demonstrado em dourada que, baixos níveis de determinados nutrientes como a vitamina A, afectam o desenvolvimento esquelético (Fernández *et al.*, 2008). Estes autores mostraram que rotíferos com níveis elevados de vitamina A promovem uma maior mineralização dos elementos esqueléticos. Outro exemplo é o descrito por Roy *et al.* (2002), que verificaram que os processos de formação de osso, mineralização e reabsorção são influenciados pela composição dietética em fósforo. Deficiências em nutrientes importantes no

metabolismo do osso poderão, assim, estar na base do atraso na mineralização verificado nesta espécie aos 15 dpf. Para uma maior compreensão sugere-se a realização de um estudo pormenorizado focado nos principais componentes da dieta que afectam o desenvolvimento do esqueleto (como cálcio, fósforo, vitaminas, lípidos e outros minerais) relacionando-os com o alimento.

Os pterigóforos parecem ser uma estrutura que surge mais tarde no desenvolvimento, comparando com as restantes estruturas analisadas (Gavaia *et al.*, 2006). Em A-A e MIX foram observados pterigóforos mineralizados aos 30 e aos 45 dpf, ao passo que em A-C não foram observados sinais de mineralização desta estrutura em nenhuma das idades amostradas. Isto sugere que, após desmame de alimento vivo (nauplius de *Artemia*) para alimento inerte (Cyclop-eezeTM) poderá ocorrer uma diminuição da mineralização de elementos esqueléticos, nomeadamente os pterigóforos, como consequência da diminuição do crescimento. Os dados relativos à mineralização sugerem, então, que nauplius de *Artemia* (A-A) e mistura entre alimento vivo e inerte (MIX) são as dietas, de entre as testadas, que promovem um desenvolvimento esquelético mais saudável.

5.2.2. Ocorrência de malformações

O desenvolvimento de malformações está intimamente relacionado com as condições de cultivo a que as espécies se encontram sujeitas (Koumoundouros *et al.*, 1997; Boglione *et al.*, 2001). A nutrição é um factor que tem, claramente, um efeito sobre o desenvolvimento esquelético e influencia o aparecimento de malformações (Cahu *et al.*, 2003; Lall & Lewis-McCrea, 2007; Kamler *et al.*, 2008; Tocher *et al.*, 2008). De acordo com os dados obtidos através da análise de malformações, verificou-se que, aos 15 dpf, a incidência de malformações em qualquer uma das dietas foi mínima. A esta idade, os elementos esqueléticos encontram-se ainda em desenvolvimento e em processo de mineralização e ossificação, pelo que, ao nível macroscópico, a determinação de anomalias existentes ou em desenvolvimento serão apenas observadas mais tarde durante o desenvolvimento. A-C foi a única dieta que, a esta idade, apresentou alguns indivíduos com malformações o que terá sido devido a esta dieta, por outra razão que não o alimento (*e.g.*, herança genética de determinados reprodutores que possam ter eventualmente contribuído significativamente mais para as posturas), ter apresentado comprimentos ligeiramente superiores. Aos 30 dpf, A-C foi a única dieta que não apresentou indivíduos com malformações, provavelmente em resultado do sub-

desenvolvimento observado nesta dieta. Aos 45 dpf, a incidência de malformações foi superior, particularmente em A-A e MIX, em que 100% dos indivíduos apresentaram vacuolização dos hipurais, contra 20% em A-C. Considerando a vacuolização dos hipurais, onde parece verificar-se uma maior diferença, os dados obtidos no presente trabalho não parecem ir de encontro aos obtidos por Kamler *et al.* (2008). Estes verificaram claras diferenças entre o nível de deformações e a dieta no ciprinídeo *Scardinius erythrophthalmus* (L.), em que peixes alimentados com uma dieta liofilizada formulada mostraram uma tendência superior de desenvolverem deformações esqueléticas, comparando com peixes alimentados com outros tipos de dietas (alimento vivo ou mistura). Uma análise mais profunda e prolongada é, portanto, necessária. Uma vez que o vermelho de alizarin S é um corante específico para o cálcio, a análise efectuada não permite determinar a origem das vacuolizações observadas. Estas podem ser devidas a 1) malformação na formação do modelo cartilágneo precursor, 2) ossificação anormal após formação cartilágnea das estruturas ou 3) mineralização incompleta do osso a esta idade. Uma análise macroscópica ao nível da cartilagem, bem como uma análise histológica pormenorizada e um prolongamento da análise até à fase de adulto tornam-se, assim, estratégias essenciais para uma maior compreensão e para a obtenção de resultados conclusivos. Porém, os resultados relativos à osteogénese sugerem que um desenvolvimento mais lento poderá promover uma correcta maturação mineral do osso e, contrariamente, um desenvolvimento mais acentuado poderá resultar numa incorrecta deposição mineral.

A análise do número de estruturas afectadas, que reflecte a gravidade das deformações sugere, apenas, um aumento em função da idade, sendo impossível qualquer comparação entre dietas, devido à elevada variabilidade dos dados. O número de unidades experimentais analisado é bastante reduzido, pelo que deverá, futuramente, ser efectuada este tipo de análise com uma quantidade bastante superior de indivíduos. Deverá, também, prolongar-se a análise até à idade de adulto, quando as deformações esqueléticas são mais frequentes e evidentes.

5.2.3. Expressão de marcadores do desenvolvimento esquelético

Para além de, claramente, afectar o desenvolvimento geral e, particularmente, o desenvolvimento esquelético ao nível tecidual, a dieta parece ter também um efeito ao nível molecular. No que diz respeito a R-A, a expressão genética de *oc* tende a ser contrária à das restantes dietas. Uma vez que a *Oc* é uma proteína associada ao processo

de deposição mineral do osso (Price *et al.*, 1976; Malone *et al.*, 1982; Boskey *et al.*, 1998) estes dados vão de encontro ao atraso na mineralização verificado em alguns elementos esqueléticos nesta dieta. Deste modo, a subsequente remoção de mineral no osso é também reduzida, levando à obtenção de níveis de expressão relativa de *mgp* inferiores às restantes dietas, como verificado. Aos 15 dpf, A-A e MIX apresentam níveis de expressão de *oc* semelhantes. Contudo, A-C apresentou níveis cerca de duas ordens de grandeza inferiores. Tendo em conta que, aos 15 dpf, tanto A-A como A-C foram apenas alimentados com nauplius de *Artemia* encontrando-se nas mesmas condições, esta diferença poderá apenas dever-se a erros ou a variabilidade inerente ao processo de amostragem. Na mesma idade, a dieta MIX apresentou níveis de expressão de *mgp* bastante superiores a A-A e a A-C, o que poderá estar, de algum modo, relacionado com uma remodelação mineral intensa. Aos 30 dpf, esta diferença não foi já verificada. A esta idade, todas as dietas parecem manter níveis semelhantes de expressão de *oc* e *mgp*. Aos 45 dpf, a expressão relativa de ambos os genes manteve-se semelhante entre A-A e MIX. Contudo, em A-C verificou-se uma sobre-expressão de *oc* relativamente aos restantes tratamentos, eventualmente como resposta ao atraso no desenvolvimento verificado nesta dieta. Os dados da expressão genética relativa destes dois marcadores do desenvolvimento esquelético mostraram tendências ao nível molecular de acordo com aquelas verificadas a um nível macroscópico. Assim, é possível assumir que a dieta possui um efeito considerável no desenvolvimento esquelético, ao nível molecular de larvas de peixe-zebra.

De um modo geral, a expressão de *oc* e *mgp* parece ser, em cada dieta, constante ao longo do desenvolvimento até aos 45 dpf, o que sugere uma intensa actividade de mineralização. A excepção é atribuída à expressão de *mgp* na dieta MIX aos 15 dpf. Em indivíduos adultos, a actividade dos marcadores do desenvolvimento esquelético diminui tal como a sua expressão (Gavaia *et al.*, 2006). Deveria ser avaliada a expressão destes genes mais tarde no desenvolvimento, até os indivíduos atingirem a fase adulta, de modo a determinar, com maior rigor, o efeito da dieta neste parâmetro ao longo de todo o desenvolvimento até ao adulto.

5.2.4. Acumulação de Oc e Mgp

A análise de acumulação das proteínas marcadoras do desenvolvimento do esqueleto não foi, de um modo quantitativo, conclusiva para a maioria dos tratamentos. Verificou-se, no entanto, uma ligeira diferença em R-A aos 15 dpf, em comparação com as

restantes dietas. Ao nível das brânquias e dos arcos branquiais, ao contrário das restantes dietas, não foi detectada a presença de nenhuma das proteínas referidas, o que indica um atraso no desenvolvimento do esqueleto, tanto ao nível cartilágneo como ósseo. A presença de Mgp e Oc nos arcos branquiais de larvas e juvenis de peixe-zebra foi já registada anteriormente (Gavaia *et al.*, 2006). É importante referir que não foi demonstrada com exactidão a componente das brânquias onde se encontravam acumuladas a Mgp e a Oc. Assumiu-se, deste modo, o osso pericondral adjacente ao espinho filamentosos cartilágneo nas brânquias (Benjamin, 1990) como os elementos nos quais se terão acumulado as proteínas, tal como foi observado em peixe-zebra e outros teleósteos (Pinto *et al.*, 2003; Simes *et al.*, 2003; Gavaia *et al.*, 2006). Entre as restantes dietas não foi detectada nenhuma diferença evidente relativamente à acumulação de Mgp e Oc nos tecidos esqueléticos. Foi, porém, de um modo geral, verificada acumulação específica de ambas as proteínas. Foram, por exemplo, observados exemplares com acumulação de Oc em torno das vértebras o que vai de encontro à especificidade da proteína para tecido ósseo, comparável com os resultados obtidos por Gavaia *et al.* (2006). Foi ainda detectada a presença de Oc na periferia de pterigóforos em mineralização, concomitantemente com a formação de osso pericondral (Witten & Huysseune, 2007). Por outro lado, foi detectada acumulação de Mgp tanto em tecido cartilágneo e ósseo como em tecidos moles. Foi observada acumulação intensa de Mgp nas vértebras, notocorda e também no rim. A associação desta proteína a tecidos moles como o rim e sistema vascular foi já descrita por vários autores (*e.g.*, Fraser & Price, 1988; Shanahan *et al.*, 1993), funcionando como inibidor de calcificação ectópica destes tecidos. Especificamente no peixe-zebra, apesar de não ter sido descrita a presença de Mgp em tecido renal, foi determinada, por outros autores, a sua presença na aorta e no bolbo cardíaco arterial (Gavaia *et al.*, 2006). A expressão de *mgp* foi já observada nos cordoblastos da notocorda de outros teleósteos (Roberto *et al.*, com. pess.), podendo estar associada à necessidade de prevenir a calcificar neste tecido. A presença de Mgp na notocorda observada no presente trabalho pode estar igualmente relacionada com este facto. Neste trabalho, foi ainda detectada acumulação evidente de Mgp na periferia das cartilagens cranianas/buciais, como na cartilagem de Meckel. Como referido anteriormente, a Mgp é uma proteína fortemente associada a cartilagem (Yagami *et al.*, 1999), pelo que os dados obtidos vão de encontro à literatura. Como resposta ao processo de ossificação foi detectada a presença tanto de Mgp como de Oc em elementos ósseos dérmicos como a calvária, na maioria dos exemplares analisados.

5.2.5. Actividade osteoclástica

Através da determinação da actividade da TRAP, à qual está associada a actividade osteoclástica, não foram verificadas diferenças no que diz respeito a locais de reabsorção óssea. Contudo, foi efectuada uma análise mais global, na qual foram identificadas diferenças entre idades. Em nenhum dos espécimes analisados com 15 dpf (de todas as dietas testadas) foram verificados locais de reabsorção óssea. Estes dados vão de encontro ao descrito na literatura (Witten *et al.*, 2001). Estes autores mostraram que as primeiras células removedoras de osso surgem, no peixe-zebra, aos 20 dpf. A partir dos 30 dpf verificou-se já actividade osteoclástica intensa em estruturas ósseas e em ossificação (intramembranosa e endocondral). Neste trabalho foi particularmente evidente actividade osteoclástica em arcos neurais, cápsulas óticas e estruturas ósseas associadas e arcos branquiais. A actividade osteoclástica verificada surge, assim, na sequência da ossificação das estruturas esqueléticas, como resposta à necessidade da sua remodelação (Karsenty, 1999; Hall & Witten, 2005).

5.3. Maturação e desenvolvimento do sistema digestivo

5.3.1. Expressão de enzimas pancreáticas

De um modo global, a expressão de *amilase* parece ser seguir a tendência já registada da actividade da proteína noutras espécies como em *Dentex dentex* (Linnaeus, 1758) (Gisbert *et al.*, 2009), mantendo níveis basais no início do desenvolvimento, com níveis superiores em fases mais intermédias e decrescendo novamente após o pico máximo de expressão. Um decréscimo da actividade e da expressão com a idade foi também registado para outras espécies, nomeadamente marinhas carnívoras (Ribeiro *et al.*, 1999; Douglas *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2001; Cahu, 2004). Ma *et al.* (2001) mostraram ainda que, ontogenicamente, a actividade de amilase parece acompanhar a expressão do seu gene. É importante, porém, ter em conta que embora pareçam apresentar tendências semelhantes, a expressão genética não se encontra necessariamente relacionada de uma forma directa com a actividade específica das enzimas. A dieta MIX não seguiu esta tendência, tendo obtido o máximo de expressão aos 15 dpf, eventualmente como resposta a uma elevada carga nutritiva e, deste modo, ao elevado esforço digestivo subsequente. A-C apresentou, aos 30 e 45 dpf, os maiores níveis de expressão do gene. Este facto pode estar relacionado com a ausência de enzimas exógenas presentes nas

presas vivas que contribuem, potencialmente, para o processo de digestão (Cahu & Zambonino Infante, 2001). Eventualmente por esta mesma razão, A-A tenha apresentado aos 45 os níveis mais baixos de expressão de *amilase*.

Gisbert *et al.* (2009) mostraram uma tendência semelhante relativamente à actividade da tripsina em níveis, no entanto, bastante superiores aos de *amilase*. Contudo, em peixes marinhos, a expressão de *tripsina* mantém-se constante até um estado de desenvolvimento avançado (Cahu *et al.*, 2004), sugerindo uma estabilização do mRNA da *tripsina* ou a regulação da expressão da mesma ao nível da tradução pelo conteúdo proteico dietético (Zambonino-Infante & Cahu, 2007). Salvas algumas excepções, os níveis de expressão desta enzima não foram muito diferentes nem entre dietas nem entre idades. Aos 15 dpf, contudo, verificou-se que na maioria das dietas, nomeadamente R-A e A-C, ocorreu uma sub-expressão de *tripsina* relativamente ao controlo de 4 dpf. Duas hipóteses são apresentadas. Em primeiro lugar, aos 4 dpf a expressão de *tripsina* detectada pode dever-se à existência de transcritos de RNA de origem maternal. Não se encontra descrita a idade à qual começa a ocorrer expressão *de novo*, pelo que deve ser uma análise a ser tida em conta em estudos futuros. Por outro lado, considerando que não existe contribuição maternal, os baixos níveis de expressão de tripsina observados em R-A podem ser indicadores de um atraso no processo de maturação do pâncreas exócrino, como referido por Fernández *et al.* (2008), por exemplo. Tendo em conta qualquer uma das hipóteses supracitadas, os níveis superiores de expressão de *tripsina* verificados em A-C aos 30 dpf podem ser devidos a um *input* proteico elevado, na sequência da oferta de Cyclop-eezeTM como alimento. Por outro lado, pode haver uma expressão do gene superior nesta dieta devido a uma necessidade acrescida da síntese da enzima, como resposta à oferta de alimento inerte. Relativamente aos peixes alimentados com presas vivas poderá, eventualmente, como referido anteriormente, ter ocorrido uma contribuição em enzimas por parte das presas (Cahu & Zambonino Infante, 2001), ainda que em pequena escala, reduzindo assim a necessidade de produção de enzimas, endogenamente. Aos 45 dpf verificou-se uma evidente sub-expressão de *tripsina* em A-A (em cerca de duas ordens de grandeza), tal como descrito para a actividade específica. Contudo, tendo em conta os dados de crescimento, seria de esperar uma situação semelhante relativamente a MIX que apresentou uma expressão superior eventualmente como resposta à elevada carga proteica do Cyclop-eezeTM, como já foi referido.

5.3.2. Desenvolvimento do tracto digestivo e descrição do desenvolvimento global

Os dados de expressão relativa dos marcadores moleculares do tracto digestivo não parecem ter uma relação com o desenvolvimento do tracto digestivo. Contudo, na sequência do atraso no desenvolvimento global de exemplares de R-A verificou-se um ligeiro atraso no desenvolvimento do tracto digestivo, nomeadamente ao nível do esófago que apresentou um aspecto mais rudimentar comparativamente aos espécimes das restantes dietas. Um atraso no desenvolvimento de estruturas do tracto digestivo como resultado da exclusão de nauplius de *Artemia* da dieta foi também demonstrado para outras espécies ao nível histológico (Papadakis *et al.*, 2009). MIX apresentou, também, um tracto digestivo ligeiramente subdesenvolvido comparativamente a A-A e A-C aos 15 dpf. Isto poderá dever-se ao facto de ser dada uma dieta mista em rotíferos e nauplius de *Artemia*, ou seja, ao alimentar-se de rotíferos a quantidade de nauplius de *Artemia* consumidos diminui reduzindo, como verificado noutros resultados do presente trabalho, a performance dos peixes. Contudo, critérios quantificáveis e um maior número de peixes analisados são essenciais para a obtenção de resultados mais conclusivos. Este trabalho permitiu também a realização de uma pequena descrição da anatomia craniana e digestiva do peixe-zebra. Foram evidenciadas as cartilagens cranianas (Benjamin, 1990), como a cartilagem de Meckel e as cartilagens trabeculares caracterizadas pela presença de condrócitos hipertróficos e as principais estruturas digestivas, como esófago, dentes faríngeos, fígado, pâncreas exócrino e intestino. O pâncreas e o fígado foram identificados na maioria dos indivíduos analisados, mesmo aos 15 dpf, órgãos ausentes aquando da eclosão nalgumas espécies mas cujo aparecimento ocorre cedo no desenvolvimento (Sarasquete & Yúfera, 1995; Gisbert *et al.*, 2004; Micale *et al.*, 2006; Sánchez-Amaya *et al.*, 2007; Hachero-Cruzado *et al.*, 2009), tendo sido possível identificar as regiões endócrina e exócrina, no caso do pâncreas.

VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos permitiram atingir a maioria dos objectivos propostos, contudo, devido a elevada variabilidade dos dados, conseqüente do reduzido número de indivíduos, não foi possível obter conclusões consistentes acerca do efeito da dieta na ocorrência de malformações, pelo que deveria ser levada a cabo uma abordagem mais pormenorizada. Não foi, de igual modo, possível detectar diferenças ao nível da remodelação óssea entre dietas, pelo que deveriam ser efectuadas amostragens mais frequentes entre os 15 e os 30 dias, de modo a determinar a idade em que este processo se torna activo e, assim, inferir acerca do efeito da dieta no mesmo. Para uma análise histológica ao nível do tracto digestivo seria aconselhável o uso de um número de indivíduos superior acoplado ao uso de um critério quantitativo rigoroso (*e.g.*, contagem do número de vilosidades intestinais em secções histológicas homólogas e quantificação de actividades enzimáticas) para a obtenção de resultados mais consistentes. Para além da determinação das regiões de acumulação dos marcadores moleculares do desenvolvimento esquelético, seria importante conhecer os padrões de expressão dos mesmos, pela aplicação de técnicas de hibridação *in situ*, de modo a avaliar o efeito da dieta ao nível das regiões de transcrição dos genes. Assim, seria possível relacionar os dados de acumulação das proteínas e de desenvolvimento esquelético com os níveis basais de expressão e inferir acerca do efeito da dieta neste processo. Para além dos objectivos propostos, foi ainda possível efectuar uma breve descrição do tracto digestivo do peixe-zebra, usando exemplares alimentados com as dietas consideradas mais adequadas.

A dieta inerte utilizada (Cyclop-eezeTM) não parece beneficiar o crescimento do peixe-zebra. Comparativamente às restantes dietas testadas, verificaram-se diferenças ao nível do crescimento e da mineralização de elementos esqueléticos após introdução deste alimento na dieta, pelo que não é aconselhável o seu uso exclusivo nas fases iniciais de desenvolvimento do peixe-zebra. Os dados sugerem que o desmame para este tipo de alimento deverá ser efectuado após os 15 dpf.

A performance do peixe-zebra parece ser bastante afectada pelo uso de rotíferos *Brachionus* sp., tendo esta dieta (R-A) obtido os valores mais reduzidos relativamente a estes parâmetros. Ao nível molecular existe também um efeito no desenvolvimento do peixe-zebra, tendo obtido atrasos consideráveis na mineralização de elementos esqueléticos associado a níveis reduzidos de expressão e acumulação dos marcadores moleculares. Os rotíferos não parecem então ser adequados a um desenvolvimento

saudável do peixe-zebra. No entanto, um estudo comparativo com rotíferos de água doce seria aconselhável.

Como tem vindo a ser sugerido, os dados obtidos mostram que nauplius de *Artemia*, parecem constituir uma dieta apropriada às fases iniciais de desenvolvimento do peixe-zebra. Poderá, ainda, ser aplicado um complemento em alimento inerte, de modo a aumentar a carga nutricional e, conseqüentemente, promover melhores resultados no cultivo de peixe-zebra.

Referências bibliográficas

- Alexis, M.N., Nengas, I., Fountoulaki, E., Papoutsi, E., Andriopoulou, A., Koutsodimou, M. & Gaubaudan, J. (1999) Tissue ascorbic acid levels in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings fed diets containing different forms of ascorbic acid. *Aquaculture*, **179**, 447-456.
- Alves Jr., T.T., Cerqueira, V.R. & Brown, J.A. (2006) Early weaning of fat snook (*Centroponus parallelus* Poey 1864) larvae. *Aquaculture*, **253**, 334-342.
- Andrades, J.A., Becerra, J. & Fernández-Llebrez, P. (1996) Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, **141**, 1-11.
- Barbazuk, W.B., Korf, I., Kadavi, C., Heyen, J., Tate, S., Wun, E., Bedell, J.A., McPherson, J.D. & Johnson, S.L. (2000) The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res*, **10**, 1351-8.
- Benjamin, M. (1989a) Hyaline-cell cartilage (chondroid) in the heads of teleosts. *Anat Embryol*, **179**, 285-303.
- Benjamin, M. (1989b) The development of hyaline-cell cartilage in the head of the black molly, *Poecilia sphenops*. Evidence for secondary cartilage in a teleost. *J. Anat.*, **164**, 145-154.
- Benjamin, M. (1990) The cranial cartilages of teleosts and their classification. *Journal of Anatomy*, **169**, 153-172.
- Benjamin, M., Ralphs, J.R. & Eberewariye, O.S. (1992) Cartilage and related tissues in the trunk and fins of teleosts. *J. Anat.*, **181**, 113-118.
- Benzakour, O. (2008) Vitamin K-dependent proteins: functions in blood coagulation and beyond. *Thromb Haemost*, **100**, 527-9.
- Berkner, K.L. (2000) The vitamin K-dependent carboxylase. *J Nutr*, **130**, 1877-80.
- Berkner, K.L. (2005) The vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Nutr*, **25**, 127-49.
- Biemar, F., Argenton, F., Schmidtke, R., Epperlein, S., Peers, B. & Driever, W. (2001) Pancreas development in zebrafish: early dispersed appearance of endocrine hormone expressing cells and their convergence to form the definitive islet. *Dev Biol*, **230**, 189-203.
- Blair, T., Castell, J., Neil, S., D'Abramo, L., Cahu, C., Harmon, P. & Ogunmoye, K. (2003) Evaluation of microdiets versus live feeds on growth, survival and fatty acid composition of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Aquaculture*, **225**, 451-461.
- Boenish, T. (2001) Basic Immunocytochemistry. In: *Handbook, Immunocytochemical staining methods* (ed T. Boenish), pp. 12-13. DAKO Corporation, California.
- Boglione, C., Costa, C., Dato, P.D., Ferzini, G., Scardi, M. & Cataudella, S. (2003) Skeletal quality assessment of reared and wild sharpsnout sea bream and pandora juveniles. *Aquaculture*, **227**, 373-394.

- Boglione, C., Gagliardi, F., Scardi, M. & Cataudella, S. (2001) Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Aquaculture*, **192**, 1-22.
- Boivin, G., Morel, G., Lian, J.B., Anthoine-Terrier, C., Dubois, P.M. & Meunier, P.J. (1990) Localization of endogenous osteocalcin in neonatal rat bone and its absence in articular cartilage: effect of warfarin treatment. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, **417**, 505-12.
- Bolliet, V., Cheewasedtham, C., Houlihan, D.F., G lineau, A. & Boujard, T. (2000) Effect of feeding time on digestibility, growth performance and protein metabolism in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: interactions with dietary fat levels. *Aquat. Living Resour.*, **13**, 107-113.
- Boskey, A.L., Gadaleta, S., Gundberg, C., Doty, S.B., Ducey, P. & Karsenty, G. (1998) Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone*, **23**, 187-96.
- Burstone, M.S. (1959) Histochemical demonstration of acid phosphatase activity in osteoclasts. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **7**, 39-41.
- Cahu, C., Infante, J.Z. & Takeuchi, T. (2003) Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, **227**, 245-258.
- Cahu, C., R nnestad, I., Grangier, V. & Zambonino Infante, J.L. (2004) Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture*, **238**, 295-308.
- Cahu, C. & Zambonino Infante, J. (2001) Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, **200**, 161-180.
- Camarda, A.J., Butler, W.T., Finkelman, R.D. & Nanci, A. (1987) Immunocytochemical localization of gamma-carboxyglutamic acid-containing proteins (osteocalcin) in rat bone and dentin. *Calcif Tissue Int*, **40**, 349-55.
- Ca navate, J.P. & Fern andez-D az, C. (1999) Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture*, **174**, 255-263.
- Cancela, L., Hsieh, C.L., Francke, U. & Price, P.A. (1990) Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix Gla protein gene. *J Biol Chem*, **265**, 15040-8.
- Cancela, M.L., Williamson, M.K. & Price, P.A. (1995) Amino acid sequence of bone Gla protein from the African clawed toad *Xenopus laevis* and the fish *Sparus aurata*. *International Journal of Peptide and Protein Research*, **46**, 419-423.
- Cancela, M.L., Ohresser, M.C., Reia, J.P., Viegas, C.S., Williamson, M.K. & Price, P.A. (2001) Matrix Gla protein in *Xenopus laevis*: molecular cloning, tissue distribution, and evolutionary considerations. *J Bone Miner Res*, **16**, 1611-21.
- Carr, S.A., Hauschka, P.V. & Biemann, K. (1981) Gas chromatographic mass spectrometric sequence determination of osteocalcin, a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from chicken bone. *J Biol Chem*, **256**, 9944-50.

- Carvalho, A.P., Araújo, L. & Santos, M.M. (2006) Rearing zebrafish (*Danio rerio*) larvae without live food: evaluation of a commercial, a practical and a purified starter diet on larval performance. *Aquaculture Research*, **37**, 1107-1111.
- Carvalho, A.P., Escaffre, A.-M., Oliva Teles, A. & Bergot, P. (1997) First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. *Aquaculture International*, **5**, 361-367.
- Castro, J., Pino-Querido, A., Hermida, M., Chavarrias, D., Romero, R., Garcia-Cortes, L.A., Toro, M.A. & Martinez, P. (2008) Heritability of skeleton abnormalities (lordosis, lack of operculum) in gilthead seabream (*Spares aurata*) supported by microsatellite family data. *Aquaculture*, **279**, 18-22.
- Chen, B.N., Qin, J.G., Kumar, M.S., Hutchinson, W.G. & Clarke, S.M. (2006) Ontogenic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture*, **260**, 264-271.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, **162**, 156-159.
- Conceição, L.E.C., Ribeiro, L., Engrola, S., Aragão, C., Morais, S., Lacuisse, M., Soares, F. & Dinis, M.T. (2007) Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, **268**, 64-81.
- Corring, T. (1980) The adaptation of digestive enzymes to the diet: its physiological significance. *Reprod Nutr Dev*, **20**, 1217-35.
- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M.R., Bergot, P. & Sorgeloos, P. (1997) Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture*, **155**, 149-164.
- Coutu, D.L., Wu, J.H., Monette, A., Rivard, G.E., Blostein, M.D. & Galipeau, J. (2008) Periostin, a member of a novel family of vitamin K-dependent proteins, is expressed by mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem*, **283**, 17991-8001.
- Curnow, J., King, J., Bosmans, J. & Kolkovski, S. (2006) The effect of reduced *Artemia* and rotifer use facilitated by a new microdiet in the rearing of barramundi *Lates calcarifer* (Bloch) larvae. *Aquaculture*, **257**, 204-213.
- Curnow, J., King, J., Partridge, G. & Kolkovski, S. (2006) Effects of two commercial microdiets on growth and survival of barramundi (*Lates calcarifer* Bloch) larvae within various early weaning protocols. *Aquaculture Nutrition*, **12**, 247-255.
- Dabrowski, K. (1984) The feeding of fish larvae: present "state of the art" and perspectives. *Reprod Nutr Dev*, **24**, 807-833.
- Dahlbäck, B. (1983) Purification of human vitamin K-dependent protein S and its limited proteolysis by thrombin. *Biochem J*, **209**, 837-46.
- Dahlbäck, B., Lundwall, A. & Stenflo, J. (1986) Primary structure of bovine vitamin K-dependent protein S. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 4199-203.
- Dahm, R. & Geisler, R. (2006) Learning from small fry: The zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Marine Biotechnology*, **8**, 329-345.
- Darrow, K.O. & Harris, W.A. (2004) Characterization and development of courtship in zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish*, **1**, 40-45.

- Dhert, P. (1996) Rotifers. In: *Manual on the production and use of live food for aquaculture - Fisheries Technical Paper 361* (eds P. Lavens & P. Sorgeloos), pp. 49-78. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department, FAO, Rome.
- Dhert, P., Rombaut, G., Suantika, G. & Sorgeloos, P. (2001) Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*, **200**, 129-146.
- Dhont, J. & Van Stappen, G. (2003) Biology, tank production and nutritional value of *Artemia*. *Live feeds in Marine Aquaculture* (eds J. G. Støttrup & L. McEvoy), pp. 65-121. Blackwell Science, Oxford.
- DiMuzio, M.T., Bhowan, M. & Butler, W.T. (1983) The biosynthesis of dentine gamma-carboxyglutamic acid-containing proteins by rat incisor odontoblasts in organ culture. *Biochem J*, **216**, 249-57.
- Dohi, Y., Tabata, S., Yamaguchi, M., Ohgushi, H. & Yonemasu, K. (2004) Characterization of the cDNA encoding bullfrog, *Rana catesbeiana*, osteocalcin and two forms of the protein isolated from bone. *Biochimie*, **86**, 471-80.
- Douglas, S.E., Mandla, S. & Gallant, J.W. (2000) Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Aquaculture*, **190**, 247-260.
- Drossou, A., Ueberschär, B., Rosenthal, H. & Herzig, K.-H. (2006) Ontogenic development of the proteolytic digestion activities in larvae of *Oreochromis niloticus* fed different diets. *Aquaculture*, **256**, 479-488.
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., Bradley, A. & Karsenty, G. (1996) Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, **382**, 448-52.
- El-Maadawy, S., Kaartinen, M.T., Schinke, T., Murshed, M., Karsenty, G. & McKee, M.D. (2003) Cartilage formation and calcification in arteries of mice lacking matrix Gla protein. *Connect Tissue Res*, **44**, 272-8.
- Ershova, T.S., Volkova, I.V. & Zaitseva, V.F. (2004) [Specific features of digestive function development in larvae of some salmonid fish]. *Ontogenez*, **35**, 291-6.
- FAO (2007) *The State of World Aquaculture and Fisheries 2006*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Favaloro, E. & Mazzola, A. (2000) Meristic character analysis and skeletal anomalies during growth in reared sharpsnout seabream. *Aquaculture International*, **8**, 417-430.
- Favaloro, E. & Mazzola, A. (2003) Meristic variation and skeletal anomalies of wild and reared sharpsnout seabream juveniles (*Diplodus puntazzo*, Cetti 1777) off coastal Sicily, Mediterranean Sea. *Aquaculture Research*, **34**, 575-579.
- Fernández-Díaz, C. & Yúfera, M. (1997) Detecting growth in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae fed microcapsules. *Aquaculture*, **153**, 93-102.
- Fernández, I., Hontoria, F., Ortiz-Delgado, J.B., Kotzamanis, Y., Estévez, A., Zambonino-Infante, J.L. & Gisbert, E. (2008) Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture*, **283**, 102-115.

- Ferreira, M., Fabregas, M.J. & Otero, A. (2008) Enriching rotifers with "premium" microalgae. *Isochrysis* aff. *galbana* clone T-ISO. *Aquaculture*, **279**, 126-130.
- Fetcho, J.R., Higashijima, S.I. & McLean, D.L. (2008) Zebrafish and motor control over the last decade. *Brain Research Reviews*, **57**, 86-93.
- Fjellidal, G., Hansen, T.J. & Berg, A.E. (2007) A radiological study on the development of vertebral deformities in cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, **273**, 721-728.
- Fraser, J.D. & Price, P.A. (1988) Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla protein. Implications for the possible functions of matrix Gla protein and for the tissue distribution of the gamma-carboxylase. *J Biol Chem*, **263**, 11033-6.
- Fraser, M.R. & de Nys, R. (2005) The morphology and occurrence of jaw and operculum deformities in cultured barramundi (*Lates calcarifer*) larvae. *Aquaculture*, **250**.
- Garcia, A.S., Parrish, C.C. & Brown, J.A. (2008) A comparison among different enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*) and their effect on Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae early growth, survival and lipid composition. *Aquaculture Nutrition*, **14**, 14-30.
- Gavaia, P. J., Sarasquete, C., Cancela, M. L. (2000) Detection of mineralized structures in early stages of development of marine *Teleostei* using a modified alcian blue - alizarin red double staining technique for bone and cartilage. *Biotechnic and Histochemistry*, **75**(2), 79-84.
- Gavaia, P.J., Simes, D.C., Ortiz-Delgado, J.B., Viegas, C.S., Pinto, J.P., Kelsh, R.N., Sarasquete, M.C. & Cancela, M.L. (2006) Osteocalcin and matrix Gla protein in zebrafish (*Danio rerio*) and Senegal sole (*Solea senegalensis*): comparative gene and protein expression during larval development through adulthood. *Gene Expr Patterns*, **6**, 637-52.
- Gaylord, T.G. & Gatlin III, D.M. (2001) Dietary protein and energy modifications to maximize compensatory growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, **194**, 337-348.
- Gerlai, R. (2003) Zebrafish: An uncharted behavior genetic model. *Behavior Genetics*, **33**, 461-468.
- Gerstenfeld, L.C. & Shapiro, F.D. (1996) Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implication of the complex functions of the hypertrophic chondrocyte during endochondral bone development. *J Cell Biochem*, **62**, 1-9.
- Gilbert, S.F. (2003) *Developmental biology*. Ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, USA.
- Gisbert, E., Giménez, G., Fernández, I., Kotzamanis, Y. & Estévez, A. (2009) Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture*, **287**, 381-387.
- Gisbert, E., Piedrahita, R.H. & Conklin, D.E. (2004) Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*, **232**, 455-470.

- Gong, Z., Wan, H., Tay, T.L., Wang, H., Chen, M. & Yan, T. (2003) Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, **308**, 58-63.
- Goolish, E.M., Okutake, K. & Lesure, S. (1999) Growth and survivorship of larval zebrafish *Danio rerio* on processed diets. *North American Journal of Aquaculture*, **61**, 189-198.
- Gorman, K.F. & Breden, F. (2007) Teleosts as models for human vertebral stability and deformity. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, **145**, 28-38.
- Gouillou-Coustans, M.F., Bergot, P. & Kaushik, S.J. (1998) Dietary ascorbic acid needs of common carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture*, **161**, 453-461.
- Gráf, L. & Szilágyi, L. (2003) Trypsin: is there anything new under the Sun? *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, **666-667**.
- Hachero-Cruzado, I., Ortiz-Delgado, J.B., Borrega, B., Herrera, M., Navas, J.I. & Sarasquete, C. (2009) Larval organogenesis of flatfish brill *Scophthalmus rhombus* L.: Histological and histochemical aspects. *Aquaculture*, **286**, 138-149.
- Hale, J.E., Fraser, J.D. & Price, P.A. (1988) The identification of matrix Gla protein in cartilage. *J Biol Chem*, **263**, 5820-4.
- Hall, B.K. (2005) *Bones and cartilage: developmental skeletal biology*. Academic Press, Nova Scotia, Canada.
- Hall, B.K. & Witten, P.E. (2005) The origin and plasticity of skeletal tissues in vertebrate evolution and development. In: *Major transitions in vertebrate evolution* (eds S. Andeson & H. D. Sues). Indiana University Press, Bloomington.
- Hamre, K. & Harboe, T. (2008) Artemia enriched with high n-3 HUFA may give a large improvement in performance of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. *Aquaculture*, **277**, 239-243.
- Han, K.M., Geurden, I. & Sorgeloos, P. (2000) Enrichment strategies for Artemia using emulsions providing different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture*, **183**, 335-347.
- Han, K.M., Geurden, I. & Sorgeloos, P. (2001) Fatty acid changes in enriched and subsequently starved Artemia franciscana nauplii enriched with different essential fatty acids. *Aquaculture*, **199**, 93-105.
- Haniffa, A.M. & Selvan, S.A. (1992) Food utilization in the common carp *Cyprinus carpio* in relation to formulated feeds. *Asian Fisheries Science*, **5**, 249-256.
- Hauschka, P.V. & Reid, M.L. (1978) Vitamin D dependence of a calcium-binding protein containing gamma-carboxyglutamic acid in chicken bone. *J Biol Chem*, **253**, 9063-8.
- Hayman, A.R., Jones, S.J., Boyde, A., Foster, D., Colledge, W.H., Carlton, M.B., Evans, M.J. & Cox, T.M. (1996) Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development*, **122**, 3151-3162.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W. & Peterson, R.E. (2005) Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*, **86**, 6-19.

- Holme, D.J. & Peck, H. (1998) *Analytical Biochemistry*. Prentice Hall, England.
- Hopkins, K.D. (1992) Reporting fish growth: a review of the basics. *J. World Aquac. Soc.*, **23**, 173-179.
- Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L. & Hernandez-Cruz, C.M. (2000) Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, **22**, 97-107.
- Jono, S., Shioi, A., Ikari, Y. & Nishizawa, Y. (2006) Vascular calcification in chronic kidney disease. *J Bone Miner Metab*, **24**, 176-81.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, K. (2005) *Basic histology. Text and atlas*. McGraw-Hill Companies, Inc., United States of America.
- Kamler, E., Wolnicki, J., Kaminski, R. & Sikorska, J. (2008) Fatty acid composition, growth and morphological deformities in juvenile cyprinid, *Scardinius erythrophthalmus* fed formulated diet supplemented with natural food. *Aquaculture*, **278**, 69-76.
- Karsenty, G. (1999) The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev*, **13**, 3037-51.
- Keller, E.T. & Murtha, J.M. (2004) The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, **138**, 335-341.
- Kim, K.-D. & Lee, S.-M. (2004) Requirement of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids for juvenile flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, **229**, 315-323.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. & Schilling, T.F. (1995) Stages of Embryonic-Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics*, **203**, 253-310.
- Kolkovski, S. (2001) Digestive enzymes in fish larvae and juveniles - implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*, **200**, 181-201.
- Köprücü, K. & Özdemir, Y. (2005) Apparent digestibility of selected feed ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, **250**, 308-316.
- Koumoundouros, G., Gagliardi, F., Divanach, P., Boglione, C., Cataudella, S. & Kentouri, M. (1997) Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. *Aquaculture*, **149**.
- Koumoundouros, G., Mainglot, E., Divanach, P. & Kentouri, M. (2002) Kyphosis in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): ontogeny and effects on mortality. *Aquaculture*, **209**, 49-58.
- Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E., Gamsiz, K. & Tandler, A. (2001) Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture*, **194**, 107-121.
- Laan, M., Richmond, H., He, C.M. & Campbell, R.K. (2002) Zebrafish as a model for vertebrate reproduction: Characterization of the first functional zebrafish (*Danio rerio*) gonadotropin receptor. *General and Comparative Endocrinology*, **125**, 349-364.

- Laizé, V., Martel, P., Viegas, C.S., Price, P.A. & Cancela, M.L. (2005) Evolution of matrix and bone gamma-carboxyglutamic acid proteins in vertebrates. *J Biol Chem*, **280**, 26659-68.
- Lall, S.P. & Lewis-McCrea, L.M. (2007) Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish - An overview. *Aquaculture*, **267**, 3-19.
- Lamason, R.L., Mohideen, M.A., Mest, J.R., Wong, A.C., Norton, H.L., Aros, M.C., Juryne, M.J., Mao, X., Humphreys, V.R., Humbert, J.E., Sinha, S., Moore, J.L., Jagadeeswaran, P., Zhao, W., Ning, G., Makalowska, I., McKeigue, P.M., O'Donnell, D., Kittles, R., Parra, E.J., Mangini, N.J., Grunwald, D.J., Shriver, M.D., Canfield, V.A. & Cheng, K.C. (2005) SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science*, **310**, 1782-6.
- Lawrence, C. (2007) The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, **269**, 1-20.
- Lazo, J.P., Mendoza, R., Holt, G.J., Aguilera, C. & Arnold, C.R. (2007) Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, **265**, 194-205.
- Lim, L.C. & Wong, C.C. (1997) Use of the rotifer, *Brachionus calyciflorus* Pallas, in freshwater ornamental fish larviculture. *Hydrobiologia*, **358**, 269-273.
- Loeser, R., Carlson, C.S., Tulli, H., Jerome, W.G., Miller, L. & Wallin, R. (1992) Articular-cartilage matrix gamma-carboxyglutamic acid-containing protein. Characterization and immunolocalization. *Biochem J*, **282** (Pt 1), 1-6.
- Lubzens, E. & Zmora, O. (2003) Production and nutritional value of rotifers. *Live feeds in Marine Aquaculture* (eds J. G. Støttrup & L. McEvoy), pp. 17-64. Blackwell Science, Oxford.
- Lundstedt, L.M., Melo, J.F. & Moraes, G. (2004) Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **137**, 331-9.
- Ma, P., Sivaloganathan, B., Reddy, P.K., Chan, W.K. & Lam, T.J. (2001) Ontogeny of α -amylase gene expression in sea bass larvae (*Lates calcarifer*). *Marine Biotechnology*, **3**, 463-469.
- Madsen, L. & Dalsgaard, I. (1999) Vertebral column deformities in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **171**, 41-48.
- Maillard, C., Berruyer, M., Serre, C.M., Dechavanne, M. & Delmas, P.D. (1992) Protein-S, a vitamin K-dependent protein, is a bone matrix component synthesized and secreted by osteoblasts. *Endocrinology*, **130**, 1599-604.
- Malone, J.D., Teitelbaum, S.L., Griffin, G.L., Senior, R.M. & Kahn, A.J. (1982) Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents. *J Cell Biol*, **92**, 227-30.
- Meeker, N.D. & Trede, N.S. (2008) Immunology and zebrafish: Spawning new models of human disease. *Developmental and Comparative Immunology*, **32**, 745-757.
- Micale, V., Garaffo, M., Genovese, L., Spedicato, M.T. & Muglia, U. (2006) The ontogeny of the alimentary tract during larval development in common pandora *Pagellus erythrinus* L. *Aquaculture*, **251**, 354-365.

- Minkin, C. (1982) Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int*, **34**, 285-290.
- Moe, S.M., Reslerova, M., Ketteler, M., O'Neill, K., Duan, D., Koczman, J., Westenfeld, R., Jahnen-Dechent, W. & Chen, N.X. (2005) Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease (CKD). *Kidney Int*, **67**, 2295-304.
- Monroig, O., Navarro, J.C., Amat, F., Gonzalez, P., Bermejo, A. & Hontoria, F. (2006) Enrichment of *Artemia nauplii* in essential fatty acids with different types of liposomes and their use in the rearing of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, **251**, 491-508.
- Morais, S., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T. & Rønnestad, I. (2004) A method for radiolabeling *Artemia* with applications in studies of food intake, digestibility, protein and amino acid metabolism in larval fish. *Aquaculture*, **231**, 469-487.
- Nakane, P.K. & Kawaoi, A. (1974) Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **22**, 1084-1091.
- Nakane, P.K. & Pierce Jr., G.B. (1966) Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **14**, 929-931.
- Neugebauer, B.M., Moore, M.A., Broess, M., Gerstenfeld, L.C. & Hauschka, P.V. (1995) Characterization of structural sequences in the chicken osteocalcin gene: expression of osteocalcin by maturing osteoblasts and by hypertrophic chondrocytes in vitro. *J Bone Miner Res*, **10**, 157-63.
- Nüsslein-Volhard, C., Gilmour, D.T. & Dahm, R. (2002) Introduction: zebrafish as a system to study development and organogenesis. In: *Zebrafish. A practical approach* (eds C. Nüsslein-Volhard & R. Dahm), pp. 1-5. Oxford University Press, New York.
- Oliva-Teles, A. (2000) Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition. *Aquaculture International*, **8**, 477-492.
- Olsen, B.R., Reginato, A.M. & Wang, W. (2000) Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 191-220.
- Önal, U. & Langdon, C. (2000) Characterization of two microparticle types for delivery of food to altricial fish larvae. *Aquaculture Nutrition*, **6**, 159-170.
- Opstad, I., Suontama, J., Langmyhr, E. & Olsen, R.E. (2006) Growth, survival, and development of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) weaned onto diets containing various sources of marine protein. *ICES Journal of Marine Science*, **63**, 320-325.
- Ortiz-Delgado, J.B., Simes, D.C., Viegas, C.S., Schaff, B.J., Sarasquete, C. & Cancela, M.L. (2006) Cloning of matrix Gla protein in a marine cartilaginous fish, *Prionace glauca*: preferential protein accumulation in skeletal and vascular systems. *Histochem Cell Biol*, **126**, 89-101.
- Pan, L.C. & Price, P.A. (1985) The propeptide of rat bone gamma-carboxyglutamic acid protein shares homology with other vitamin K-dependent protein precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 6109-13.

- Papadakis, I.E., Zaiss, M.M., Kyriakou, Y., Georgiou, G., Divanach, P. & Mylonas, C.C. (2009) Histological evaluation of the elimination of *Artemia* nauplii from larval rearing protocols on the digestive system ontogeny of shi drum (*Umbrina cirrosa* L.). *Aquaculture*, **286**, 45-52.
- Pearse, A.G.E. (1985) *Histochemistry, theoretical and applied. Analytical technology*. Churchill Livingstone, New York, USA.
- Perez-Jimenez, A., Guedes, M.J., Morales, A.E. & Oliva-Teles, A. (2007) Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. *Aquaculture*, **265**, 325-335.
- Pinto, J.P., Conceicao, N., Gavaia, P.J. & Cancela, M.L. (2003) Matrix Gla protein gene expression and protein accumulation colocalize with cartilage distribution during development of the teleost fish *Sparus aurata*. *Bone*, **32**, 201-10.
- Pinto, J.P., Ohresser, M.C. & Cancela, M.L. (2001) Cloning of the bone Gla protein gene from the teleost fish *Sparus aurata*. Evidence for overall conservation in gene organization and bone-specific expression from fish to man. *Gene*, **270**, 77-91.
- Poser, J.W. & Price, P.A. (1979) A method for decarboxylation of gamma-carboxyglutamic acid in proteins. Properties of the decarboxylated gamma-carboxyglutamic acid protein from calf bone. *J Biol Chem*, **254**, 431-6.
- Pratt, C.W. & Cornely, K. (2004) *Essential biochemistry*. John Wiley and Sons, Inc., USA.
- Price, P.A., Fraser, J.D. & Metz-Virca, G. (1987) Molecular cloning of matrix Gla protein: implications for substrate recognition by the vitamin K-dependent gamma-carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 8335-9.
- Price, P.A. & Nishimoto, S.K. (1980) Radioimmunoassay for the vitamin K-dependent protein of bone and its discovery in plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 2234-8.
- Price, P.A., Otsuka, A.A., Poser, J.W., Kristaponis, J. & Raman, N. (1976) Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 1447-51.
- Price, P.A., Urist, M.R. & Otawara, Y. (1983) Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun*, **117**, 765-71.
- Price, P.A. & Williamson, M.K. (1985) Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. *J Biol Chem*, **260**, 14971-5.
- Price, P.A., Williamson, M.K., Haba, T., Dell, R.B. & Jee, W.S. (1982) Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 7734-8.
- Price, P.A., Williamson, M.K. & Lothringer, J.W. (1981) Origin of the vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone. *J Biol Chem*, **256**, 12760-6.
- Proudfoot, D. & Shanahan, C.M. (2006) Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein. *Nephrology (Carlton)*, **11**, 455-61.

- Pyati, U.J., Look, A.T. & Hammerschmidt, M. (2007) Zebrafish as a powerful vertebrate model system for in vivo studies of cell death. *Seminars in Cancer Biology*, **17**, 154-165.
- Rapley, R. (2000a) Molecular biology and basic techniques. *Principles and techniques of practical biochemistry* (eds K. Wilson & J. Walker), pp. 80-137. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Rapley, R. (2000b) Molecular cloning and gene analysis. *Principles and techniques of practical biochemistry* (eds K. Wilson & J. Walker), pp. 138-205. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C. & Dinis, M.T. (1999) Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture*, **179**, 465-473.
- Rønnestad, I., Thorsen, A. & Finn, R.N. (1999) Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture*, **177**, 201-216.
- Ross, M., Kaye, G. & Pawlina, W. (2003) *Histology: A Text and Atlas with Cell and Molecular Biology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Roy, P.K. & Lall, S.P. (2003) Dietary phosphorus requirement of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Aquaculture*, **221**, 451-468.
- Roy, P.K., Witten, P.E., Hall, B.K. & Lall, S.P. (2002) Effects of dietary phosphorus on bone growth and mineralisation of vertebrae in haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, **27**, 35-48.
- Sánchez-Amaya, M.I., Ortiz-Delgado, J.B., García-López, Á., Cárdenas, S. & Sarasquete, C. (2007) Larval ontogeny of redbanded seabream *Pagrus auriga* Valenciennes, 1843 with special reference to the digestive system. A histological and histochemical approach. *Aquaculture*, **263**, 259-279.
- Santigosa, E., Sánchez, J., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J. & Gallardo, M.A. (2008) Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. *Aquaculture*, **282**, 68-74.
- Sarasquete, M.C., Polo, A. & Yúfera, M. (1995) Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture*, **130**, 79-92.
- Sfakianakis, D.G., Georgakopoulou, E., Papadakis, I.E., Divanach, P., Kentouri, M. & Koumoundouros, G. (2005) Environmental determinants of haemal lordosis in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, **254**, 54-64.
- Sfakianakis, D.G., Koumoundouros, G., Divanach, P. & Kentouri, M. (2004) Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L. 1758). Temperature effect on the development plasticity and morpho-anatomical abnormalities. *Aquaculture*, **232**, 407-424.
- Shan, X.J., Quan, H.F. & Dou, S.Z. (2008) Effects of delayed first feeding on growth and survival of rock bream *Oplegnathus fasciatus* larvae. *Aquaculture*, **277**, 14-23.

- Shanahan, C.M., Weissberg, P.L. & Metcalfe, J.C. (1993) Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, **73**, 193-204.
- Shikano, T., Ando, D. & Taniguchi, N. (2005) Relationships of vertebral deformity with genetic variation and heterosis in the guppy *Poecilia reticulata*. *Aquaculture*, **246**, 133-138.
- Shum, L. & Nuckolls, G. (2002) The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. *Arthritis Res*, **4**, 94-106.
- Simes, D.C., Williamson, M.K., Ortiz-Delgado, J.B., Viegas, C.S., Price, P.A. & Cancela, M.L. (2003) Purification of matrix Gla protein from a marine teleost fish, *Argyrosomus regius*: calcified cartilage and not bone as the primary site of MGP accumulation in fish. *J Bone Miner Res*, **18**, 244-59.
- Simes, D.C., Williamson, M.K., Schaff, B.J., Gavaia, P.J., Ingleton, P.M., Price, P.A., Cancela, M.L. (2004) Characterization of Osteocalcin (BGP) and Matrix Gla Protein (MGP) fish specific antibodies: validation for immunodetection studies in lower vertebrates. *Calcified Tissue International*, **74**, 170-180.
- Slack, J.M. (1995) Developmental biology of the pancreas. *Development*, **121**, 1569-80.
- Sommer, B., Bickel, M., Hofstetter, W. & Wetterwald, A. (1996) Expression of matrix proteins during the development of mineralized tissues. *Bone*, **19**, 371-80.
- Sorgeloos, P., Dhert, P. & Candreva, P. (2001) Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, **200**, 147-159.
- Spence, R., Fatema, M.K., Ellis, S., Ahmed, Z.F. & Smith, C. (2007) Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, **71**, 304-309.
- Spitsbergen, J.M. & Kent, M.L. (2003) The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research--advantages and current limitations. *Toxicol Pathol*, **31 Suppl**, 62-87.
- Sprague, J., Bayraktaroglu, L., Clements, D., Conlin, T., Fashena, D., Frazer, K., Haendel, M., Howe, D.G., Mani, P., Ramachandran, S., Schaper, K., Segerdell, E., Song, P., Sprunger, B., Taylor, S., Van Slyke, C.E. & Westerfield, M. (2006) The Zebrafish Information Network: the zebrafish model organism database. *Nucleic Acids Research*, **34**, D581-D585.
- Sprague, J., Doerry, E., Douglas, S., Westerfield, M. & Grp, Z. (2001) The Zebrafish Information Network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research. *Nucleic Acids Research*, **29**, 87-90.
- Steffens, W. & Wirth, M. (2007) Influence of nutrition on the lipid quality of pond fish: common carp (*Cyprinus carpio*) and tench (*Tinca tinca*). *Aquaculture International*, **15**, 313-319.
- Strauss, P.G., Closs, E.I., Schmidt, J. & Erfle, V. (1990) Gene expression during osteogenic differentiation in mandibular condyles in vitro. *J Cell Biol*, **110**, 1369-78.
- Sumanas, S. & Lin, S. (2004) Zebrafish as a model system for drug target screening and validation. *Drug Discovery Today: TARGETS*, **3**, 89-96.

- Takahashi, H., Hanano, M., Hayashi, S., Arai, Y., Yoshino, N., Takakuwa, E., Tatewaki, W., Nagayama, R., Takizawa, S. & Shibata, A. (1986) Plasma levels of protein C and vitamin K-dependent coagulation factors in patients on long-term oral anticoagulant therapy. *Tohoku J Exp Med*, **149**, 351-7.
- Teitelbaum, S.L. (2007) Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol*, **170**, 427-35.
- Tocher, D.R., Bendiksen, E.A., Campbell, P.J. & Bell, J.G. (2008) The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, **280**, 21-34.
- Trenzado, C.E., de la Higuera, M. & Morales, A.E. (2007) Influence of dietary vitamins E and C and HUFA on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance under crowding conditions. *Aquaculture*, **263**, 249-258.
- Vagner, M., Robin, J.H., Zambonino-Infante, J.L. & Person-Le Ruyet, J. (2007) Combined effects of dietary HUFA level and temperature on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. *Aquaculture*, **266**, 179-190.
- Van Stappen, G. (1996) *Artemia*. In: *Manual on the production and use of live food for aquaculture - Fisheries Technical Paper 361* (eds P. Lavens & P. Sorgeloos), pp. 79-251. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department, FAO, Rome.
- Viegas, C.S., Pinto, J.P., Conceicao, N., Simes, D.C. & Cancela, M.L. (2002) Cloning and characterization of the cDNA and gene encoding *Xenopus laevis* osteocalcin. *Gene*, **289**, 97-107.
- Vogel, A.M. & Weinstein, B.M. (2000) Studying vascular development in the zebrafish. *Trends in Cardiovascular Medicine*, **10**, 352-360.
- Wallin, R., Cain, D. & Sane, D.C. (1999) Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells--a cell system which resembles the system in bone cells. *Thromb Haemost*, **82**, 1764-7.
- Wan, H., He, J., Ju, B., Yan, T., Lam, T.J. & Gong, Z. (2002) Generation of two-color transgenic zebrafish using the green and red fluorescent protein reporter genes gfp and rfp. *Mar Biotechnol (NY)*, **4**, 146-54.
- Westerfield, M. (2007) *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. University of Oregon Press, Eugene.
- Whitfield, T.T., Mburu, P. & Hardisty-Hughes, R.E. (2005) Models of congenital deafness: mouse and zebrafish. *Drug Discovery Today: Disease Models*, **2**, 85-92.
- Wiedemann, M., Trueb, B. & Belluoccio, D. (1998) Molecular cloning of avian matrix Gla protein. *Biochim Biophys Acta*, **1395**, 47-9.
- Witten, P.E., Hansen, A. & Hall, B.K. (2001) Features of mono- and multinucleated bone resorbing cells of the zebrafish *Danio rerio* and their contribution to skeletal development, remodeling, and growth. *Journal of Morphology*, **250**, 197-207.

- Witten, P.E. & Huysseune, A. (2007) Mechanisms of chondrogenesis and osteogenesis in fins. *Fins into limbs: evolution, development, and transformation* (ed B. K. Hall), pp. 79-92. The University of Chicago Press, Chicago.
- Witten, P.E., Huysseune, A., Franz-Odenaal, T., Fedak, T., Vickaryous, M., Cole, A. & Hall, B.K. (2004) Acellular teleost bone: dead or alive, primitive or derived? *The Palaeontology Newsletter*, **55**, 37-41.
- Witten, P.E., Obach, A., Huysseune, A. & Baeverfjord, G. (2006) Vertebrae fusion in Atlantic cod (*Salmo salar*): Development, aggravation and pathways of containment. *Aquaculture*, **258**, 164-172.
- Wong, M. & Medrano, J. (2005) Real-time PCR for mRNA quantification. *BioTechniques*, **39**, 75-85.
- Yagami, K., Suh, J.Y., Enomoto-Iwamoto, M., Koyama, E., Abrams, W.R., Shapiro, I.M., Pacifici, M. & Iwamoto, M. (1999) Matrix GLA protein is a developmental regulator of chondrocyte mineralization and, when constitutively expressed, blocks endochondral and intramembranous ossification in the limb. *J Cell Biol*, **147**, 1097-108.
- Yanong, R.P.E. (1999) Nutrition of ornamental fish. *Husbandry and Nutrition*, **2**, 19-42.
- Yee, N.S., Lorent, K. & Pack, M. (2005) Exocrine pancreas development in zebrafish. *Dev Biol*, **284**, 84-101.
- Yufera, M. & Darias, M.J. (2007) The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, **268**, 53-63.
- Zambonino Infante, J. & Cahu, C. (1999) High dietary levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *The Journal of Nutrition*, 1195-1200.
- Zambonino Infante, J.L. & Cahu, C.L. (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, **130**, 477-487.
- Zambonino Infante, J.L. & Cahu, C.L. (2007) Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: applications to diet formulation. *Aquaculture*, **268**, 98-105.

Anexos

ANEXO 1

Tabela IV: Sequências de nucleótidos dos *primers* utilizados na determinação dos níveis relativos de expressão de *mgp*, *oc*, *tripsina* e *amilase* por PCR em Tempo Real e do respectivo gene controle, *ef1a*.

Gene		Sequência dos <i>primers</i>
<i>mgp</i>	Fw	5' - TGTTGTTCTGGCTCTCGGTGCT - 3'
	Rev	5' - CACCTCCGCACGCCGCTC - 3'
<i>oc</i>	Fw	5' - CTGCCTGATGACTGTGTGTGTGAGCG - 3'
	Rev	5' - GGCGGCATGATTCCAGACG - 3'
<i>tripsina</i>	Fw	5' - CGCTGGTTTTATGGAGGGAGGC - 3'
	Rev	5' - GGGCACAGCCATAACCCCAGGA - 3'
<i>amilase</i>	Fw	5' - ATCTTGGCAGCGTTGGTTGGGC - 3'
	Rev	5' - GGTCCGAGGTAACGCTCACATT - 3'
<i>ef1a</i>	Fw	5' - ACGCCCTCCTGGCTTTCACCC - 3'
	Rev	5' - TGGGACGAAGGCAACTGGC - 3'

ANEXO 2

Tampão TCT

Tampão Coons com 0.1% Triton X-100.

0.1 M Tampão Coons

0.1M (2.06 g) Veronal (Barbital sódico - $C_8H_{11}N_2NaO_3$)

0.15M (8.5 g) NaCl

H₂O até 980 ml

pH acertado para 7.4 com HCl 0.1 N

Volume acertado com H₂O para 1l.

0.05M Tris HCl

6 g Trizma base

H₂O até 980 ml

pH acertado para 7.6 com HCl concentrado

Volume acertado com H₂O para 1l.

DAB

Dissolveram-se 25 mg de DAB em 100 ml 0.05 Tris HCl pH 7.6

A solução foi filtrada e foram adicionados 10 µl H₂O₂.

ANEXO 3

Parte deste trabalho foi apresentada sob forma de poster no Congresso Nacional de Bioquímica na Universidade dos Açores, em Ponta Delgada, nos dias 23 a 25 de Outubro de 2008.

Effect of diet in skeleton development of zebrafish (*Danio rerio*) larvae and juvenile fish

J. Cardeira da Silva^a, G. Dionísio^a, A. Bensimon Brito^a, M. L. Cancela^a, P. J. Gavaia^a

^aCCMAR, Universidade do Algarve

The development of skeletal deformities is one of the major problems associated to intensive, large-scale culture of fish species, affecting growth, development and ultimately, survival of produced fish. Selection of the appropriate diet is also essential for larval survival and growth, with a strict correlation with skeletal development. Mineralization-related genes, such as matrix Gla protein (*mgp*) and osteocalcin (*oc* or bone Gla protein), play an important role during bone and cartilage development, and their expression levels seem to be related to the appearance of skeletal abnormalities. Although regulation of gene expression by dietary profile is extensively studied in mammals, it still lacks more in depth investigation in developing fish. In order to determine the effect of diet in development of zebrafish larvae and juveniles, different food regimes (*Artemia* nauplii, rotifers, and inert food) were tested. From 5 days post fertilization (dpf) until 45 dpf, growth and mortality were registered daily for each treatment. Skeletal deformities were characterized after whole-mount staining with the histological markers alizarin red and alcian blue, which allowed detailed detection of both calcium deposition and cartilage formation. The relative expression levels of *mgp* and *oc* of whole specimens were evaluated by quantitative Real Time PCR. The results obtained suggest that the diet has a significant effect on skeletal development of zebrafish larvae and juveniles, providing evidences for the importance of diet optimization to achieve zebrafish optimal development.

This work was funded by project FCT/POCI/MAR/60883/2004 (XenoFish). G. Dionisio and A. Bensimon Brito are recipients of CCMAR and FCT fellowships references CCMAR/BTI/0005/2008 and SFRH/BD/40573/2007, respectively.